

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA- GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Ave Merisalu

**Detoksifikatsioonisüsteemi geenide variatsioonid ja
mehepoolne viljatus**

Magistritöö

Juhendajad:
Signe Altmäe, M.Sc
Maire Peters, Ph.D
Andres Salumets, Ph.D

**Tartu
2007**

Sisukord

Lühendid ja mõisted.....	4
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Meeste reproduktiivtervis ja ksenobiootilised ühendid	7
1.2 Arüülsüsivesinike retseptori signaalirada	8
1.2.1 Meeste viljatus ja AhR signaalirada	10
1.3 Faas I detoksifikatsiooniensüümid	13
1.4 Faas II detoksifikatsiooniensüümid	16
1.5 Faas III transporterid	19
1.6 Geneetiline varieeruvus detoksifikatsioonikaskaadi geenides	21
2. Töö eesmärk	23
3. Materjal ja meetodika	24
3.1. Patsiendid	24
3.2 Polümeraasi ahelreaktsioon	24
3.3 Mutatsioonide detekteerimine	27
3.3.1. Sekveneerimine	27
3.3.2 <i>Arrayed Primer Extension</i> (APEX)	28
3.3.2.1 PCR produktide ettevalmistamine APEX reaktsiooniks	28
3.3.2.2 APEX reaktsioon ja signaalide detekteerimine	28
3.4 Andmete statistiline analüüs	29
4. Tulemused	31
4.1 Kliinilised andmed	31
4.2 Genotüpiseerimise tulemused	32
4.2.1 Geneetilised variatsioonid <i>AhR</i> , <i>AhRR</i> ja <i>ARNT</i> geenides	32
4.2.2 Geneetilised variatsioonid faas I detoksifikatsiooniensüümide (<i>CYP1A1</i> , <i>CYP1A2</i> ja <i>CYP1B1</i>) geenides	33
4.2.3 Geneetilised variatsioonid faas II detoksifikatsiooniensüümide (<i>SULT1A1</i> , <i>GSTA1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTM3</i> , <i>GSTP1</i> , <i>NQO1</i> , <i>EPHX1</i>) geenides	36
4.2.4 Geneetilised variatsioonid faas III transporterite (<i>MDR1</i> , <i>ABCG2</i>) geenides	39
5. Arutelu	40
5.1 AhR signaalirada	40
5.2 Faas I detoksifikatsiooniensüümid	42
5.3 Faas II detoksifikatsiooniensüümid	44
Kokkuvõte	51
Summary	52
Tänuavaldused	53
Kasutatud kirjandus	54
Lisad	64

Lühendid ja mõisted

ABC	ATP-binding cassette
ABCG2	ATP-binding cassette transporter G2
AhR	arüülsüivesinike retseptor (<i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>)
AhRR	arüülsüivesinike retseptori repressor (<i>Aryl hydrocarbon Receptor Repressor</i>)
APEX	oligonukleotiidmaatriksil põhinev primerekstensioon (<i>Arrayed Primer Extension</i>)
ARE	antioksidatiivne vastuselement (<i>Antioxidant Response Element</i>)
ARNT	arüülsüivesinike retseptori tuumatranslokaator (<i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>)
AS-PCR	alleelspetsiifiline polümeraasi ahelreaktsioon
BaP	benzo(a)püreen
bHLH	aluseline heeliks-pööre-heeliks motiiv (<i>basic Helix-loop-Helix</i>)
bp	aluspaar
CAR	konstitutiivne androstaani retseptor (<i>Constitutive Androstane Receptor</i>)
Cy 3	tsüaniinvärv 3
Cy 5	tsüaniinvärv 5
CYP450	tsütokroom P450
D'	standardiseeritud LD koefitsent D
dATP	desoksüadenosiin trifosfaat
dCTP	desoksütsütidin trifosfaat
ddH ₂ O	kahekordselt destilleeritud vesi (<i>double distilled water</i>)
dGTP	desoksüguanosiin trifosfaat
dTTP	desoksütümidin trifosfaat
dUTP	desoksüuridin trifosfaat
ERE	östrogeeni vastuselement (<i>Estrogen Response Element</i>)
EPHX (EH)	epoksiid hüdrolaas
FITC	fluorestseiniisotiotsüanaat
FSH	folliikuleid stimuleeriv hormoon (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>)
GSH	reduitseeritud glutatioon
GST	glutatioon-S-transferaas
HAH	halogeenitud aromaatsed süivesinikud (<i>Halogenated Aromatic Hydrocarbons</i>)
Hsp90	kuumašoki valk 90 (<i>Heat shock protein 90</i>)
HW	Hardy – Weinbergi tasakaal
LH	luteiniseeriv hormoon
MRP1	Multiravimi resistentsusega seotud valk 1 (<i>Multidrug resistance-associated protein-1</i>)
MRP2	Multiravimi resistentsusega seotud valk 2 (<i>Multidrug resistance-associated protein-2</i>)
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NQO	NAD(P)H: kinoon oksidoreduktaas
OR	riskifaktor (<i>Odds Ratio</i>)
p	kromosoomi lühike õlg
PAH	polütsükliised aromaatsed süivesinikud (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PAPS	3'-fosfoadenosiin 5'-fosfosulfaat
PAS	(Per, Arnt/AhR, Sim <i>homology</i>) motiiv
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PXR	pregnaani X retseptor (<i>Pregnane X Receptor</i>)
SNP	ühenukleotiidne polümorfism (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
snRNA	väike tuuma RNA, (<i>small nuclear RNA</i>)

SULT	sulfotransferaas
q	kromosoomi pikk õlg
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> 'e DNA polümeraas
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenso- <i>p</i> -dioksiin
TxR	Texas Red värv
U	ühik
UNG	uratsiil-N-glükosülaas
WHO	<i>World Health Organization</i>
XAP2	hepatiit B viirus X-seotud valk
XRE	ksenobiootiline vastuselement (<i>Xenobiotic Response Element</i>)

Sissejuhatus

Lastetus on laialt levinud meditsiiniline probleem, millega võib kokku puutuda kuni 15% paaridest. Mehepoolse viljatuse osakaaluks loetakse umbes 40%. Paljudel juhtudel on viljatuse diagnoos teada. Põhilise komponendi moodustavad geneetilised põhjused (Klinefelteri sündroom, Y kromosoomi mikrodeletsioonid jt). Samuti on oluline osa elu jooksul läbipõetud haigustel (mumps, sugulisel teel levivad haigused).

Samas jääb umbes kolmandik põhjustest raskesti defineeritavaks. Sellist diagnoosi nimetatakse idiopaatiliseks. Arvatakse, et üsna suurt mõju viljatuse kujunemisel võib omada meie elukeskkonna saastatus mitmesuguste sünteetiliste ühenditega. Paljude mõju neist on loomkatsetega juba kindlaks tehtud, kuid üsna suure osa puhul ei ole täpne efekt veel selge. Lisaks eksisteerib ka selliseid ühendeid, mille toimet inimesele veel aimatagi ei osata, kuid mis suuremal või vähemal määral organismi kahjulikult mõjutada võivad. Avastati ju polüklooritud bifenüülide toimegi alles aastaid hiljem pärast nende massilist kasutuselevõttu. Inimorganism omab kaitsesüsteemi, et sinna sattunud kahjulikud ühendid organismist kiiresti väljutada. Selleks on välja kujunenud detoksifikatsioonisüsteem, mis omab olulist rolli nende ühendite kahjutustamisel.

Kui välja jätta konkreetse ametikutse tõttu suurema koguse kahjulikele ühenditele eksponeeritus (näiteks tehasetöötajad), on kokkupuude nende ühenditega tavaliselt madalal tasemel ning ei oma organismile drastilist mõju. Kuna detoksifikatsioonisüsteem on aktiivne ka ksenobiootilistele ühendite suhtes eriti tundlikus reproduktiivsüsteemis, arvatakse, et polümorfismid neid ühendeid metaboliseerivate ensüümide geenides võivad põhjustada eelsoodumust viljatuse kujunemisele.

Haigusseoseliste markerite leidmiseks teostatakse assotsiatsiooniuuringuid. Neis uuringuis enimkasutatvateks markeriteks on ühenukleotiidsed polümorfismid (SNP-d). Tänu SNP genotüpiseerimismeetodite kiirele arengule on võimalik üheaegselt genotüpiseerida korraga suur hulk markereid, võimaldades teostada suuremahulisi assotsiatsiooniuuringuid.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli läbi viia assotsiatsiooniuuring Eesti populatsioonis, et selgitada kas detoksifikatsioonisüsteemi geenide polümorfismidel on roll mehepoolse viljatuse kujunemisel. Uuring viidi läbi koostöös TÜK Androloogiakeskusega.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Meeste reproduktiivtervis ja ksenobiootilised ühendid

Meeste reproduktiivtervist on jälgitud juba aastaid mitmel pool maailmas. Paljude uuringute kohaselt on toimunud reproduktiivtervise halvenemine, lisaks vähijuhtumite ning suguelundite anomaaliade sageduse tõusule on täheldatud ka sperma kvaliteedi langust (Carlsen *et al.*, 1992, Auger *et al.*, 1995, Swan *et al.*, 2000, De Jager *et al.*, 2006). Kuigi mitmed teadlased on selle trendi kahtluse alla seadnud, ollakse kokkuvõttes siiski ühel nõul, et reproduktiivtervise halvenemine, sealhulgas spermakvaliteedi langus, on kasvav probleem sõltudes suuresti geograafilisest asukohast (Becker&Berhane, 1997, Swan *et al.*, 2000).

Reproduktiivtervise halvenemise üheks peamiseks põhjuseks arvatakse olevat keskkonna saastatus mitmesuguste kemikaalidega (Colborn *et al.*, 1993, Sharpe&Skakkebaek, 1993, Moline *et al.*, 2000, Mantovani, 2006). Erinevate uuringutega on näidatud, et (pidev) kokkupuude toksiliste ühenditega mõjutab mehe viljakust, kõige sagedamini vähendades seemnerakkude hulka ja liikuvust ning/või viies seemnerakkude kuju muutumiseni (De Celis *et al.*, 2000, De Jager *et al.*, 2006).

Inimesed on oma igapäevaelus pidevalt kokkupuutes erinevate looduslike ja tööstuslike kemikaalidega, millest paljud omavad organismile kahjulikku toimet. Teatud ksenobiootilised ühendid, nn endokriinsed katkestajad (*endocrine disrupters*), on muuhulgas võimelised ka imiteerima endogeenseid hormoone, antagoniseerima endogeensete hormoonide efekte, häirima endogeensete hormoonide sünteesi ja metabolismi ning katkestama hormoonretseptorite sünteesi (Amaral Mendes, 2002).

Endokriinsete katkestajate hulka kuulub lai spekter erinevaid ühendeid, millest tuntumad on halogeenitud aromaatsed süsivesinikud (HAH – *Halogenated Aromatic Hydrocarbons*) nagu näiteks dioksiinid ja furaanid (Ross, 2004). Mainitud kemikaalid vabanevad keskkonda näiteks puidu ning tööstuslike materjalide põletamisel. Samuti satuvad need ühendid keskkonda mitmete keemiliste ja termiliste protsesside kõrvalproduktina (näiteks klooritud ühendite produktsioon) (Toppari *et al.*, 1996). Ühe ksenobiootiliste ühendite rühmana tuuakse tihti välja ka polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) nagu näiteks püreenid, mis tekivad orgaanilise materjali (fossiilsed kütused, puit, rasv) mittetäielikul põlemisel. PAH-e leidub ka sigaretisuitsus (Phillips, 1999).

Põhiliseks ksenobiootiliste ühendite allikaks inimorganismile on toit ja vesi, kuid märkimisväärne osa neist siseneb organismi ka läbi hingamisteede (Phillips, 1999, Amaral Mendes, 2002).

Arvatakse, et ksenobiootiliste kemikaalide, eelkõige aga just endokriinsete katkestajate sihtmärk on suguhormoonide ja türoidhormoonide homeostaas. Näiteks kokkupuude endokriinsete katkestajatega nii *in utero* kui ka pärast sündi omab negatiivset efekti reproduktiivsüsteemi normaalsele arengule. Veelgi enam, loomkatsed on näidanud, et ka pärast suguküpseks saamist võivad ksenobiootilised ühendid organismi reproduktiivsüsteemi püsivalt mõjutada (Peterson *et al.*, 1993). Seega on tõenäoline, et isegi madalal tasemel, kuid krooniline keskkonnatoksikantidega kokkupuutumine pärast suguküpsust võib omada ka inimese puhul kahjulikke tagajärgi (Colborn *et al.*, 1993). Kõige eelpoolmainitu tõttu on ilmselt põhjendatud ka arvamus, mille kohaselt kolmandik idiopaatsest viljatusest on põhjustatud keskkonnatoksikantide kahjulikust toimest reproduktiivsüsteemile (Valdez&Petroff, 2004).

1.2 Arüülsüivesinike retseptori signaalirada

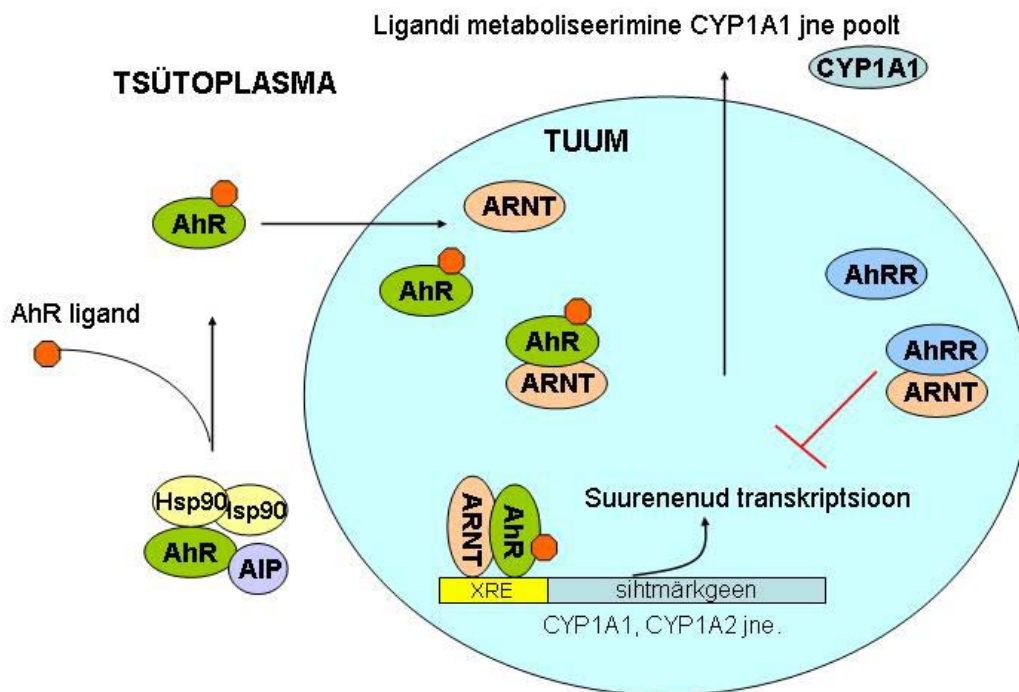
Paljud keskkonnatoksikandid (sealhulgas endokriinsed katkestajad) avaldavad oma mõju organismile läbi arüülsüivesinike retseptori (AhR – *Aryl Hydrocarbon Receptor*) signaaliraja (Nakata *et al.*, 2006). Nimetatud signaalirada on sattunud tähelepanu alla just uurides AhR ligandide mõju inimese tervisele (Swanson&Bradfield, 1993, Safe, 1994).

AhR signaaliraja esimeseks, initsieerivaks etapiks on ligandi seondumine retseptorile (AhR) (Joonis 1). AhR on ligand-sõltuv transkriptsioonifaktor, mille eksogeensete ligandidena tuntakse mitmeid keskkonnatoksikante, näiteks paljud polütsükliliste aromaatsete süivesinike hulka kuuluvad ühendid ning halogeenitud aromaatsed süivesinikud, millest tuntuim on dioksiin (Hankinson, 1995). Samuti on näidatud, et looduslikult esinevatest ühenditest võivad mitmed AhR ligandid olla ka taimset päritolu (Moon *et al.*, 2006). Kuigi endogeenset ligandi veel täpselt ei teata, on kandidaatideks pakutud trüptofaani analooge indirubiini ning indigot. Arvatakse, et endogeensed ligandid võivad olla ka koespetsiifilised (Adachi *et al.*, 2001).

Inaktiivne arüülsüivesinike retseptor asub tsütoplasmas ning on seotud mitmete valkudega - Hsp90, hepatiit B viirus X-seotud valk (XAP2) ja p23 valk (Perdew, 1988, Carver&Bradfield, 1997, Kazlauskas *et al.*, 1999). Ligandi seondumisel muutub AhR konformatsioon nii, et avaneb tuumalokalisatsioonisignaal (*nuclear localization signal* - NLS) ning AhR-ligand kompleks liigub raku tuuma. Transaktivatsiooniaktiivsuse saavutamiseks on vajalik AhR dimeriseerumine arüülsüivesinike retseptori tuuma translokaatoriga (ARNT – *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Moodustunud heterodimeer tunneb ära XRE (*Xenobiotic Response Element*) elemendi(d) märklaudgeeni regulatoorsetes piirkondades ning on seondudes võimeline indutseerima märklaudgeeni transkriptsiooni (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1987). AhR signaaliraja märklaudgeenide hulka kuuluvad mitmed faas I (näiteks CYP1A1,

CYP1A2 jt) ja faas II detoksifikatsiooniensüümide (näiteks GSTA1, NQO1 jt), aga ka mitmed muud geenid (näiteks *Bax*, HES-1) (Rowlands&Gustafsson, 1997, Matikainen *et al.*, 2001, Thomsen *et al.*, 2004).

AhR signaalirada on kontrollitud negatiivse tagasiside mehhanismiga, mida teostab AhR repressor (AhRR – *Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor*). Lisaks muudele märklaudgeenidele seondub AhR-ARNT kompleks ka AhRR geeni regulatoorses piirkonnas olevatele XRE järjestustele, initsieerides nii geeniekspressiooni. Funktsionaalne AhRR konkureerib Ah retseptoriga, moodustades ARNT valguga kompleksi ning blokeerides XRE järjestused (Mimura *et al.*, 1999). Transkriptsiooni aktivatsiooni järel eksporditakse AhR tuumast välja ning degradeeritakse proteosoomides (Pollenz, 2002, Song&Pollenz, 2002).



Joonis 1. AhR signaalirada. Ligandi sidunud retseptor (AhR) liigub tuuma, kus dimeriseerub tuuma translokaatoriga (ARNT). Moodustunud heterodimeer indutseerib sihtmärkgeeni transkriptsiooni seondudes XRE järjestusele. Sihtmärkgeenide hulgas on detoksifikatsiooniensüümid, mis viivad läbi ligandi metaboliseerimise protsesse ning ka AhR repressor (AhRR), mis teostab antud signaalirajas negatiivset tagasisidet.

Mitmete katsetega on kindlaks tehtud, et AhR rada ei ole vajalik ainult keskkonnamürkide kahjutustamiseks. Katsed AhR *knock-out* hiirtega on näidanud, et kõnealune signaalirada on tähtis mitmete organite normaalseks arenguks ja homeöstaasiks. Nii on AhR *knock-out* hiirtel täheldatud immuundefitsiitsust ning südame hüpertroofiat. Lisaks arvatakse AhR olevat oluline maksa, kopsude ning ka reproduktiivsüsteemi normaalseks arenguks ja funktsioneerimiseks (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995, Robles *et al.*, 2000, Lin *et al.*, 2001, Mandal, 2005). ARNT valgu olemasolu on organismi arengus lausa kriitiline, sest ARNT *knock-out* hiired ei ole eluvõimelised (Kozak *et al.*, 1997). Nüüdseks on näidatud, et AhR (signaalirajal) on oluline roll nii rakutsükli reguleerimises kui ka apoptoosis (Ma&Whitlock, 1996, Zaher *et al.*, 1998, Reiners&Clift, 1999, Puga *et al.*, 2002).

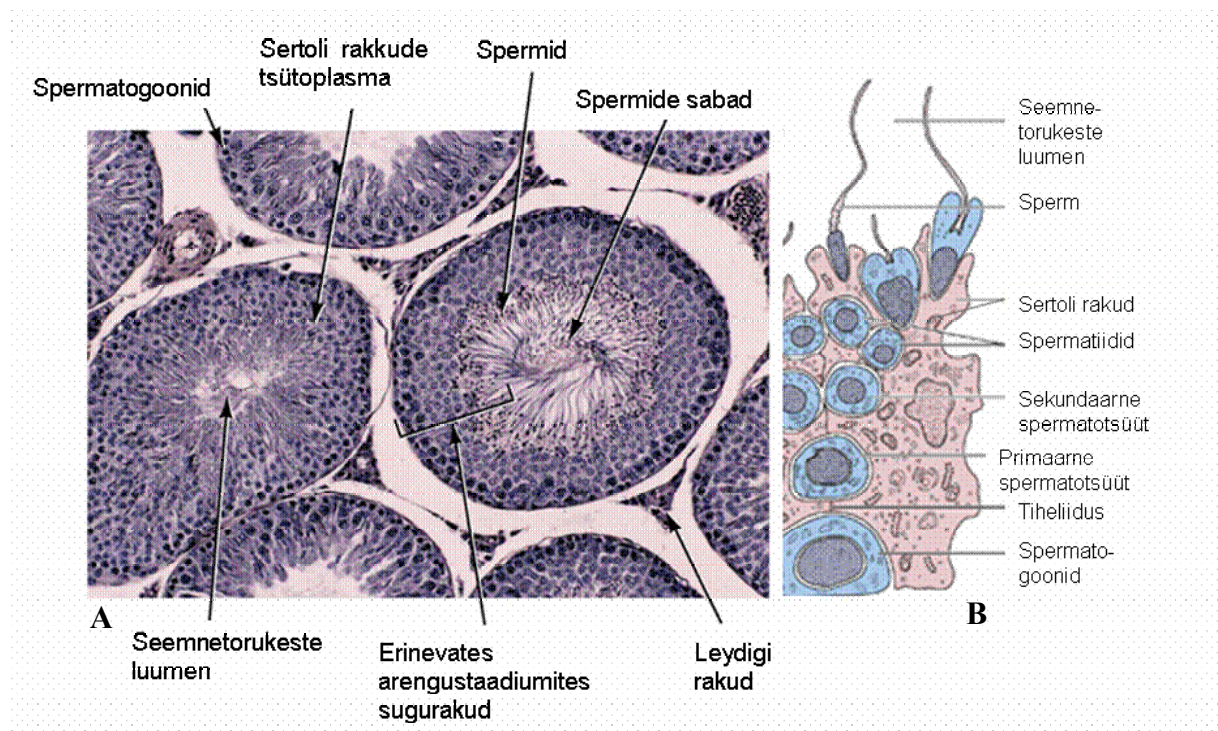
AhR, AhRR ning nende ühine partnermolekul ARNT on struktuurilt sarnased kuuludes kõik samasse geeniperekonda, mida iseloomustab aluseline heeliks-pööre-heeliks (bHLH) ning PAS (Per, Arnt/AhR, Sim *homology*) motiiv. PAS perekonna valgud viivad läbi erinevaid bioloogilisi protsesse, sealhulgas tsirkadiaansete rütmide regulatsiooni (CLOCK, PER), neurogeneesi (SIM), kontrollivad mitmeid arengulisi ja füsioloogilisi sündmusi ning osalevad hüpoksia vastuses (HIF-1 α , HIF-2 α /HLF) (Gu *et al.*, 2000). AhR ning selle signaaliraja olulisus organismi arengus ja füsioloogilistes protsessides viitab endogeense ligandi olemasolule, mida siiani ei ole õnnestunud kindlaks teha. Lisaks on AhR signaalirada suhteliselt konserveerunud, selle raja esinemist on näidatud mitmetes organismides ning signaaliraja tähtsust näitab ka suhteliselt väike polümorfismide arv vastavates geenides (Harper *et al.*, 2002, Karchner *et al.*, 2002).

1.2.1 Meeste viljatus ja AhR signaalirada

AhR raja komponente ekspresseeritakse mitmetes kudedes, sealhulgas reproduktiivsüsteemis (Richardson *et al.*, 1998). Samas ei ole teada kindlat mehhanismi, mis läbi AhR signaaliraja kaudu rakku sisenevate ühendite toksilisus avaldub. On arvatud, et just seondumine AhR-le ning sellele järgnev geeniekspressiooni mõjutamine-initsieerimine omavad rolli nende ühendite toksilise mõju vahendamises organismile (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995, Mandal, 2005). Lisaks on viidatud ka võimalikele muutustele signaalkinaaside aktiivsuses (el-Sabeawy *et al.*, 1998). Mainitud võimalustele lisab kaalu ka see, et paljud AhR ligandid ei ole organismile otseselt toksilised. Näiteks HAH hulka kuuluv 2,3,7,8-tetraklorodibenso-*p*-dioksiin (TCDD) ei seonu DNA-ga otseselt, vaid tema toksilisus avaldub läbi signaaliradade katkestamise-vahetusegamise või sekundaarsete DNA-ga seonduvate ühendite produktsioonis (Mandal, 2005).

Imetajate spermatogeneesi iseloomustab keeruline protsesside kaskaad, mis lubab diploidsetest tüvirakkudest moodustada kõrgelt diferentseerunud seemnerakke (Joonis 2).

Spermatogeneesi toimub seemnetorukesi vooderdavas epiteelis. Selle epiteeli moodustavad arenevad sugurakud ning neid toetavad Sertoli rakud. Spermatogeneesi esimesed etapid algavad spermatogoon A (tüvirakk) jagunemisega, mille tulemusel moodustub üks uus tüvirakk ning teine tüviraak, mis jätkab mitootilist jagunemist ja diferentseerumist. Protsessi tulemuseks on primaarne spermatotsüüt, mis läbib esimese meiootilise jagunemise andes kaks sekundaarset spermatotsüüti. Meioosi teises jagunemises moodustuvad sekundaarsetest spermatotsüütidest haploidsed spermatiidid.



Joonis 2. A) Ristlõige seemnetorukestest, B) Spermatogeneesi lihtsustatud skeem (<http://www.colorado.edu/kines/Class/IPHY3430-200/image/figure20f.jpg>).

Protsessi jooksul, mida nimetatakse spermiogeneesiks läbivad spermatiidid viimased muutused tuumas (geneetilise materjali kondenseerumine) ja tsütoplasmas (akrosoomi ja saba moodustumine, üleliigse tsütoplasma eemaldamine) ning tulemusena moodustuvad spermid. Viimase etapina toimub spermiatsioon ehk spermide vabanemine Sertoli rakkudest seemnetorukeste luumenisse. Spermatogeneesi normaalseks toimumiseks on oluline ka germinaalse epiteeli (arenevad sugurakud ning neid toetavad Sertoli rakud) ning seemnetorukeste vahel asetsevate Leydigi rakkude omavaheline koordineeritud funktsioneerimine (Joonis 2) (Bustos-Obregon *et al.*, 1975). Iga häiring selles keerulises

süsteemis võib viia vähi, spermatogeneesi katkestamise või sperma kvaliteedi languseni (Toppari *et al.*, 1996).

Kuigi arenev reproduktiivsüsteem teatakse olevat väga tundlik näiteks TCDD-le (100 korda vastuvõtlikum, kui täiskasvanul), on sugurakkude degeneratsiooni, vähenenud spermatogeneesi ja langenud viljakust täheldatud ka TCDD-ga mõjutatud täiskasvanud loomadel (Chahoud *et al.*, 1992, Peterson *et al.*, 1993). Katsed loomudel on näidanud, et isegi lühiajaline TCDD-ga mõjutamine häirib rakkudevahelist kommunikatsiooni Sertoli ja külgnevate sugurakkude vahel, viies spermatogeensete rakkude kahjustumiseni (Moore *et al.*, 1985, Pohjanvirta&Tuomisto, 1994, Gray *et al.*, 1997). Niisiis võib viljatuse kujunemiseks indiviidi kokkupuude ksenobiootiliste ühenditega olla toimunud *in utero* või varajases lapseas, kui reproduktiivsüsteem on kõige tundlikum keskkonna mõjutustele. Samas ei saa kindlasti välistada pidevat, kuigi madalal tasemel kokkupuudet kogu elu vältel, mis koostoimes geneetiliste variatsioonidega AhR signaaliraja või sellega seotud geenides võib samuti kaasa aidata infertiilsuse kujunemisele.

Sperma produktsioon on folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH – *Follicle Stimulating Hormone*) ja testosterooni kontrolli all. Sertoli rakud, mille jagunemine on otseselt sõltuv FSH stimulatsioonist, on jagunemisvõimelised embrüonaalsel perioodil ning enne puberteeti, hiljem nende jagunemine peatub. Spermi produktsiooni võime sõltub omakorda Sertoli rakkude arvust seemnetorukestes, kusjuures iga Sertoli rakk toetab vaid teatud arvu spermatogeenseid rakke. Katseloomadel on näidatud, et nii *in utero* kui ka postnataalsel perioodil enne suguküpsaks saamist vähendab mõningate ksenobiootiliste ühenditega kokkupuutumine Sertoli rakkude jagunemisvõimet. Seega, häiritud FSH stimulatsioon viib häireteni Sertoli rakkude jagunemises, mis omakorda põhjustab testikulaarse mahu vähenemist ning sperma kontsentratsiooni langust (Sharpe&Skakkebaek, 1993, Toppari *et al.*, 1996).

On ilmselge, et hormoonide roll spermatogeneesis ja reproduktiivsüsteemi normaalses funktsioneerimises on hädavajalik. Moore ja kollegid (1985) näitasid oma töös, et keskkonnamürkide toksiline efekt mehe reproduktiivsüsteemile võib olla põhjustatud plasma androgeenide vähenemisest, mis omakorda väljendub spermatogeneesi häirumises (Moore *et al.*, 1985). Hilisemates töödes on näidatud, et AhR signaalirada interakteerub mitmete steroidhormooni retseptoritega. Näiteks on AhR-ARNT heterodimeerid võimelised inhibeerima östrogeeni signaalirada kas seondudes XRE järjestustega külgnevatele või kattuvatele östrogeeni vastuselementidele (ERE – *Estrogen Response Element*) või viies

östrogeeniretseptori degradeerimisele (Klinge *et al.*, 1999, Wormke *et al.*, 2003, Ohtake *et al.*, 2007). Sarnased mehhanismid on tõenäoliselt vastutavad ka AhR signaaliraja ja androgeeni retseptori omavahelises kahekõnes, mis toimub suure tõenäosusega just AhR pideval aktiveerimisel agonistide poolt (Jana *et al.*, 1999, Lin *et al.*, 2004).

Keskkonna kemikaalid, mis mõjuvad organismile läbi AhR signaaliraja võivad viljakust mõjutada mitmel viisil. Häirides hormoonretseptorite normaalset funktsioneerimist, sekkub AhR ksenobiootiliste ühendite toimel viljatuse kujunemisse kaudselt. AhR signaaliraja valkude ekspressioon inimese testises pakub nende ühendite kahjuliku toime vahendamiseks aga ka muid võimalusi.

Arvatakse, et AhR signaalirada on võimeline indutseerima või võimendama spermatogeensete rakkude apoptoosi (Matikainen *et al.*, 2001, Schultz *et al.*, 2003). On teada, et sugurakud lähevad apoptoosi hormooni- ja seerumivabas (see tähendab ellujäämissignaali puudumisel) kultuuris, samuti on sugurakkudes näidatud proapoptootilise *Bax* geeni ekspressiooni (Rodriguez *et al.*, 1997). Matikainen ja kolleegid (2001) näitasid, et aktiveeritud AhR indutseerib *Bax* geeni ekspressiooni (Matikainen *et al.*, 2001). Veelgi enam, kuna FSH ning AhR looduslik konkureeriv inhibiitor resveratrol on võimelised seemnerakke apoptoosi eest kaitsma, ollakse arvamisel, et AhR on võimeline seemnerakkudes apoptoosi läbi *Bax* geeni kas indutseerima või võimendama (Rodriguez *et al.*, 1997, Revel *et al.*, 2001, Schultz *et al.*, 2003).

Seega, AhR ja ARNT valkude leidumine inimese testikulaarses koes (ning ka spermis) võib pakkuda seletust sellele, kuidas keskkonnatoksikandid on võimelised läbi AhR konstitutiivse aktiveerimise otseselt segama normaalset spermatogeneesi ja seega ka normaalset reproduktiivsust, põhjustades lõppkokkuvõttes raku surma ning sellest tulenevalt seemnerakkude kontsentratsiooni vähenemist (Schultz *et al.*, 2003, Khorram *et al.*, 2004).

Nagu eelpool kirjeldatud, võib aktiveeritud AhR signaalirada mõjutada reproduktiivsüsteemi normaalset funktsioneerimist mitmel viisil. Kõnealuse signaaliraja üheks põhiliseks sihtmärgiks peetakse aga detoksifikatsiooniensüümide geenide ekspressiooni aktiveerimist. Ilmselt on selle süsteemi ülesandeks AhR ligand retseptori reguleerimise eesmärgil metaboliseerida (Nebert *et al.*, 2000). See omakorda on järgmine tee, mis võib vahendada ksenobiootiliste ühendite kahjulikku toimet reproduktiivsüsteemile. Järgnevalt tulebki vaatluse alla ligandiga seotud AhR poolt käivitatud detoksifikatsioonikaskaad.

1.3 Faas I detoksifikatsiooniensüümid

Ksenobiootiliste, sealhulgas AhR signaaliraja kaudu sisenevate ühendite metabolism koosneb üldistatult faas I ja faas II süsteemidest, kus esimeses osas toimub substraadi (näiteks AhR

ligandi) oksüdatsioon ning teises faas I produktide konjugatsioon. Selle protsessiga lisatakse substraatidele väga hüdrofiilsed grupid, muutes ühendi sekretsiooni lihtsamaks (Nakata *et al.*, 2006).

Faas I detoksifikatsiooniensüümide alla kuuluvad tsütokroom P450 (CYP450) superperekonna valgud, mis üldjuhul omavad monooksügenaaset aktiivsust. Suurem osa neist osaleb nii endogeensete (rasvhapped, steroolid, steroidi jne) kui ka eksogeensete kemikaalide (ravimid, keskkonnamürgid) metaboliseerimises (Nebert&Russell, 2002). CYP450 valgud on membraanseoselised valgud, millest enamik asub endoplasmaatilises retiikulumis, üksikud lokaliseeruvad ka mitokondris (Guengerich, 2003).

CYP ensüümid on tavaliselt indutseeritavad, vajades aktiveerumiseks või aktiivse ensüümi hulga suurenemiseks eelneva etapi komponendi (näiteks ligand-aktiveeritav retseptor) poolt initsieerimist. Induksioon toimub transkriptsiooni ja/või translatsiooni suurendamisega või ensüümi stabiliseerimise tulemusena ning on aeglane regulatoorne protsess (Lin&Lu, 2001). CYP1 perekonna (CYP1A1, 1A2 ja 1B1) ensüümid on AhR signaaliraja ühtedeks otsestest sihtmärkgeenidest (Mimura&Fujii-Kuriyama, 2003). Seni on XRE järjestust leitud lisaks CYP1 perekonna geenidele ka 2A8, 19 geenide regulatoorsetest piirkondadest, viidates tõenäolisele AhR signaaliraja poolt aktiveeritavusele (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1987, Shen&Whitlock, 1992, Mimura&Fujii-Kuriyama, 2003, Fujii-Kuriyama&Mimura, 2005). Teistesse (CYP2, 3, 4 jne) perekondadesse kuuluvate ensüümide geeniekspressiooni algatajaks on valdavalt muud retseptorid (CAR – *Constitutive Androstane Receptor*; PXR – *Pregnane X Receptor*) (Honkakoski&Negishi, 2000).

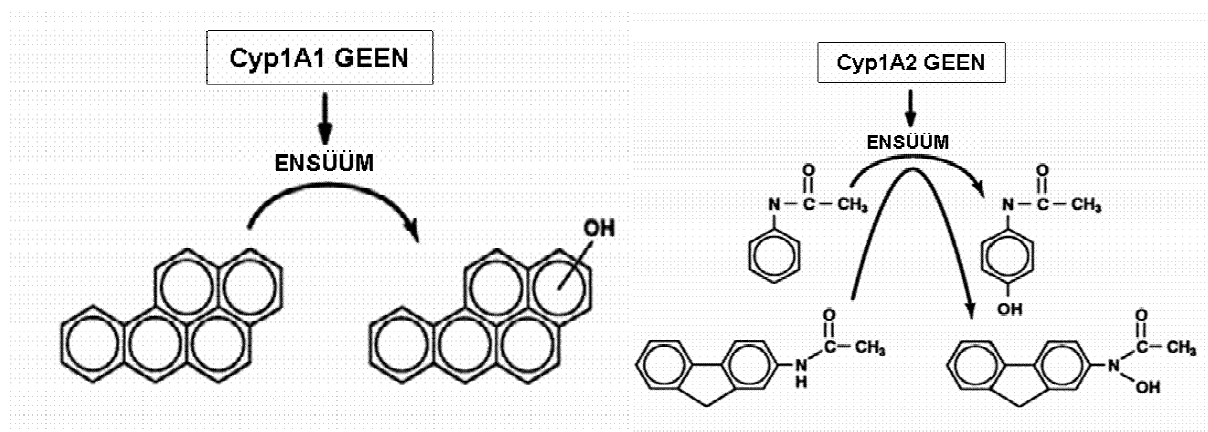
CYP valkude katalüütiline mehhanism seisneb molekulaarse hapniku redutseerimises ning substraati oksüdatiivsete või peroksüdatiivsete muutuste viimises. Kuna paljud faas I ensüümide substraadid on hüdrofoobsed, on nende organismist väljaviimise esimeseks etapiks neisse nn „keemilise käepideme“ sisestamine. See on esimene samm ühendi hüdrofiilsemaks muutmisel.

CYP450 valkude aktiivsait sisaldab heemi. Heemis olev raud on võimeline moodustama kompleksi hapnikuga ning aktiveeritud hapnik reageerib erinevate elektroni-doonoritega. CYP valgu aktiivsaiidi kuju positsioneerib substraadi nii, et vastav elektrondonor aktiveeritud hapnikule ka eksponeeritakse (Yasui *et al.*, 2005). Endoplasmaatilises retiikulumis olevad CYP450 ensüümid saavad elektronid flavoproteiin NADPH-P450 oksidoreduktaasilt (Guengerich, 2003).

Elektroni ülekande efektiivsus NADPH-lt P450-le varieerub P450 isovormide vahel suuresti, kuid jääb tavaliselt alla 50% (Tan *et al.*, 1997). Seetõttu tekib süsteemis pidevalt reaktiivseid hapniku ühendeid (Yasui *et al.*, 2005). Väikeses koguses $O_2^{\cdot -}$ ja H_2O_2 tekkimine CYP

ensüümide katalüütilise tsükli kõrvalproduktidena käib nende valkude normaalse funktsioneerimise juurde (Shertzer *et al.*, 1998). Rakule kahjulikult hakkab mõjuma see siis, kui nende radikaalide tootmine on drastiliselt suurenenud. Nii võib juhtuda näiteks ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsioonil, kus CYP valkude aktiivsus on tavalisest märkimisväärselt suurenenud (Puntarulo&Cederbaum, 1998). Näiteks CYP1A1 aktivatsioon benso(a)püreeni (BaP) ja TCDD poolt viib oksüdatiivse stressi tekkele rakus (Shertzer *et al.*, 1998, Morel *et al.*, 1999). Reaktiivsed hapnikuühendid on võimelised indutseerima rakus oksüdatiivseid kahjustusi, näiteks teostama lipiidide peroksüdatsiooni, inaktiveerima ensüüme, põhjustama apoptoosi, raku transformatsiooni jne (Sharma&Agarwal, 1996, Wang *et al.*, 2003).

Faas I reaktsioonides muudetakse ksenobiootikud reaktiivseteks tekitades molekuli funktsionaalse, tavaliselt elektrofiilse, tsentri (Joonis 3) (Brooks *et al.*, 1999, Schuppe *et al.*, 2000). Lisaks kõrvalproduktidena tekkivatele hapnikuühenditele võib selle protsessi käigus toimuda ka ksenobiootilise ühendi aktiveerimine, nii et toksiline vaheühend on võimeline seonduma rakus olevate makromolekulidega (näiteks DNA) (Schuppe *et al.*, 2000).



Joonis 3. Näiteid faas I detoksifikatsiooniensüümide poolt läbiviidavatest reaktsioonidest (Nebert *et al.*, 2000).

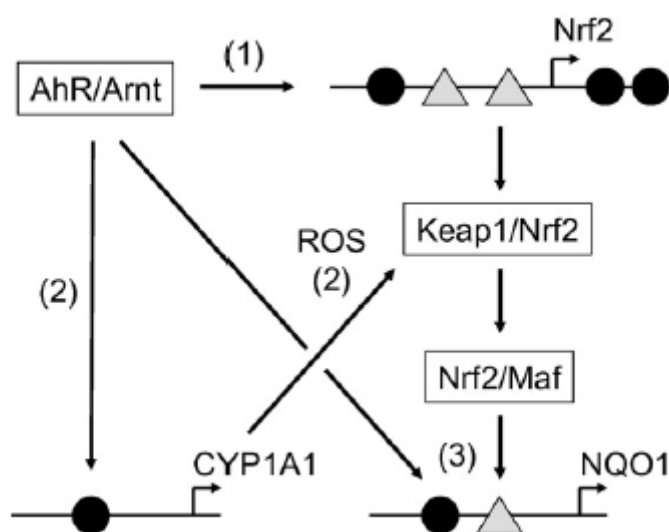
Testised arvatakse olevat ühed kõige tundlikumad organid keskkonnamürkide toimele (Schultz *et al.*, 2003, Simanainen *et al.*, 2004). Spermi plasmamembraani polüküllastumata rasvhapete kõrge sisalduse tõttu on need rakud eriti tundlikud ka oksüdatiivsele stressile. Reaktiivsed hapnikuühendid on muuseas võimelised peroksüdeerima küllastumata rasvhappeid, mis omakorda võib põhjustada ebanormaalselt akrosomaalreaktsiooni ja pärssida spermi ootsüti läbivat võimet. Veelgi enam, idiopaatilise viljatusega meeste seemnevedelik

ning sperma omab kõrgemat reaktiivsete hapnikuühendite taset võrreldes normaalse fertiilsusega meestega (Alkan *et al.*, 1997). Normaalsel füsioloogilisel tasemel on reaktiivsed hapnikuühendid spermis vajalikud toimides signaalmolekulidena ning olles olulised viljastumisprotsessis (Sharma&Agarwal, 1996).

1.4 Faas II detoksifikatsiooniensüümid

Ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsiooni teist etappi viivad läbi faas II ensüümid. Kui faas I ensüümid tekitavad molekulile elektrofilse tsentri, siis faas II ensüümide ülesandeks on reaktiivsete vaheühendite konjugeerimine, et moodustuksid piisavalt veeslahustuvad ja seega kergemini organismist erituvad ühendid. Seetõttu on faas I ja II valkude koordineeritud ekspressioon ja regulatsioon oluline määramaks, kui tõsist efekti keskkonna toksikantidega kokkupuutumine organismile omab.

Faas II ensüümide induksioon võib olla AhR sõltuv või AhR sõltumatu, viimase puhul indutseeritakse ekspressioon Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) poolt. Nrf2 asub tsütoplasmas ning muudetakse aktiivseks elektrofiilsete ning oksüdatiivsete ühenditega (oksüdatiivse stressi poolt). Nrf2 moodustab kompleksi muude reguleerivate valkudega ning seondub omakorda antioksidatiivsele vastuselemendile (ARE – *antioxidant response element*) (Joonis 4) (Miao *et al.*, 2005). Veel hiljuti arvati, et AhR–XRE ja Nrf2–ARE signaalirajad töötavad üksteisest sõltumatult, kuid nüüdseks on mitmed uuringud näidanud, et ARE indutseerija vajab mõnikord ka AhR osalust (Ma *et al.*, 2004, Miao *et al.*, 2005, Korashy&El-Kadi, 2006).



Joonis 4. Võimalikud AhR ning Nrf2 signaaliteede kokkupuutepunktid. (1) Nrf2 geeni aktiveerimine AhR poolt; (2) Nrf2 aktiveerimine CYP1A1-genereeritud ROS/elektrofiilide poolt; (3) otsene AhR/XRE ja Nrf2/ARE interaktsioon tulenevalt XRE (must ring) ja ARE

(kolmnurk) elementide lähedusest sihtmärkgeeni (antud juhul NQO1) regulatoorses alas. Erinevad mehhanismid on liigi-ja rakuspetsiifilised (Köhle&Bock, 2007).

Järgnevalt tulevad lähemalt vaatluse alla erinevad AhR ligande metaboliseerivad faas II ensüümid.

NAD(P)H: kinoon oksidoreduktaasid (NQO) on flavoensüümid, mis teostavad laia spektri substraatide, peamiselt kinoonide redutseerimist. Reaktsioon toimub 2-elektroni kaupa ning selline variant on rakule palju ohutum kui ühe elektroni redokstsükkel, sest viimane initsieerib molekulaarse hapniku juuresolekul reaktiivsete hapnikuühendite tekke (Nebert *et al.*, 2000). NQO perekonda kuulub kaks isovormi: NQO1 ja NQO2. Kui NQO1 on nüüdseks klassifitseeritud kui detoksifikatsiooniprotsessides osalev ensüüm, siis NQO2 funktsioon on siiani jäänud küsitavaks (Vella *et al.*, 2005). NQO1 on ühelt poolt indutseeritav PAH ja HAH poolt läbi AhR signaaliraja, teiselt poolt aktiveerub see ensüüm vastusena oksüdatiivsele stressile (Kristiansen *et al.*, 1999, Ross&Siegel, 2004, Köhle&Bock, 2007).

Nii taimset päritolu kui faas I ensüümide poolt PAH ning HAH ühendite metaboliseerimise käigus produtseeritud kinoonid on elektrofiilsed ühendid, mis on võimelised reaktiivsete hapnikuühendite tootmist mitmekordselt suurendama (Talalay&Dinkova-Kostova, 2004).

NQO1 funktsioon seisneb kinoonide konverteerimises stabiilsemateks ühenditeks (hüdrokinoonideks), mis edasi konjugeeritakse näiteks glutatiooniga ning väljutatakse rakust (Vella *et al.*, 2005). Et NQO omab olulist rolli reaktiivsete metaboliitide kahjutustamisel ning oksüdatiivse stressi vähendamisel, näitab ka NQO *knock-out* hiirtel ksenobiootiliste ühendite poolt indutseeritud kartsinogeens (Ross&Siegel, 2004).

Glutatioon-S-transferaasid (GST) on perekond tsütosoolseid või mikrosomaalseid ensüüme, mis katalüüsivad redutseeritud glutatioon (GSH) sõltuvaid reaktsioone (Hayes&Pulford, 1995). GST perekonda kuuluvaid ensüüme on klassikaliselt peetud osaks raku kaitsesüsteemist mitmete kahjulike endo- ja eksogeensete ühendite vastu. Samuti on GST perekonda kuuluvad valgud võtmeensüümideks kaitses oksüdatiivse stressi poolt tekitatava kahju vastu (Aydemir *et al.*, 2007). Reaktsioon kujutab endast GSH lisamist laiale valikule erineva keemilise struktuuriga elektrofiilidele. Siia hulka kuuluvad ka näiteks PAH epoksiidid, mis genereeritakse faasis I CYP450 ensüümide poolt või kõrvalproduktina oksüdatiivses stressis. Mainitud ühendite konjugeerimist teostavad eelkõige tsütosoolsete GST valkude hulka kuuluvad ensüümid.

Loomudelitel on näidatud GST valkude eriti kõrget ekspressiooni testises, seda nii tsütosoolsete kui membraanseotud GST valkude puhul ning sel arvatakse olevat spermatogeneesi kaitsev toime (DePierre&Morgenstern, 1983, Castellon, 1999).

Sulfotransferaaside (SULT) perekonna valgud viivad läbi konjugeerimisreaktsioone, mille käigus toimub sulfonaatühma ülekande doonormolekulilt hüdroksüül või aminogrupile. Doonormolekuliks on neis reaktsioonides 3'-fosfoadenosiin 5'-fosfosulfaat (PAPS) (Gamage *et al.*, 2006). Sulfotransferaase on kaheksa, ühed asuvad Golgi kompleksis ning vastutavad valkude, lipiidide ning glükoosaminoglükaanide sulfoneerimise eest; teised on tsütosoolsed ning osalevad eelkõige just ksenobiootiliste ühendite metabolismis (Falany, 1997, Gamage *et al.*, 2006).

Nii nagu enamik detoksifikatsioonienzyme, leidub ka SULT valke laias spektris kudedes. Ekspressioonimustri kohta inimese testikulaarses koes andmed puuduvad, kuid rottide puhul on näidatud SULT valkude, täpsemalt SULT1A1, ekspresseerumist ka testises (Dunn&Klaassen, 1998).

Epoksiid hüdrolaasid (EH, ka EPHX) katalüüsivad erinevaid epoksiidide hüdrolyüsiprotsesse, mille tulemusena moodustuvad reeglina vähem reaktiivsed dihüdrodiolid, mis edasisel konjugeerimisel teiste faas II ensüümide poolt muudetakse piisavalt hüdrofiilseks, et rakust väljutada. Kuna epoksiidsideme hüdrolyüs on energiaajaliselt soovitav, vajab EH kosubstraadina vaid vett (Morisseau&Hammock, 2005). Põhilisteks eksogeenseteks substraatideks on ksenobiootiliste ühendite epoksiid-derivaadid, millest mõned oma reaktiivsuse tõttu on vastutavad elektrofiilsete reaktsioonide eest bioloogiliste makromolekulidega. Epoksiide võivad genereerida ka tsütokroom P450 valgud oma substraadi metaboliseerimise käigus (Fretland&Omiecinski, 2000).

Epoksiid hüdrolaasidest uuritumad on tsütosoolne EH, mille osalemist on näidatud eelkõige põletikuliste protsesside ja vererõhu reguleerimises ning mikrosomaalne EH, mis vastutab põhiliselt ksenobiootiliste ühendite metabolismi eest (Fretland&Omiecinski, 2000). Nii katseloomade kui inimese puhul on näidatud selle ensüümi kõrget ekspresseerumist testises (Mukhtar *et al.*, 1978, DiBiasio *et al.*, 1991, Tetlow&Board, 2004).

Teatud tingimustel võib ka faas II ensüümide poolt tekkida reaktiivseid metaboliite (Rushmore&Kong, 2002, Ross&Siegel, 2004). Reaktiivse metaboliidi tekkimine on üldjuhul sõltuv substraadist. Kuigi hüdrolyüs viib tavaliselt ühendite reaktiivsuse vähenemiseni, võib mõningatel erandjuhtudel toimuda hoopis kolmandat järku toksiliste ühendite moodustumine. Nii on leitud, et epoksiid hüdrolaas võib konverteerida PAH hulka kuuluva benzo(a)püreen-4,5-epoksiidi kõrgelt reaktiivsesse diool-epoksiidi vormi; samuti, et ksenobiootiliste ühendite

(näiteks hüdroksümetüül polütsükliklised aromaatsed süsivesinikud) sulfoneerimisel võivad tekkida kõrgelt reaktiivsed elektrofiilid, mis on nii mutageensed kui ka kartsinogeensed (Sims *et al.*, 1974, Conney, 1982, Morisseau&Hammock, 2005).

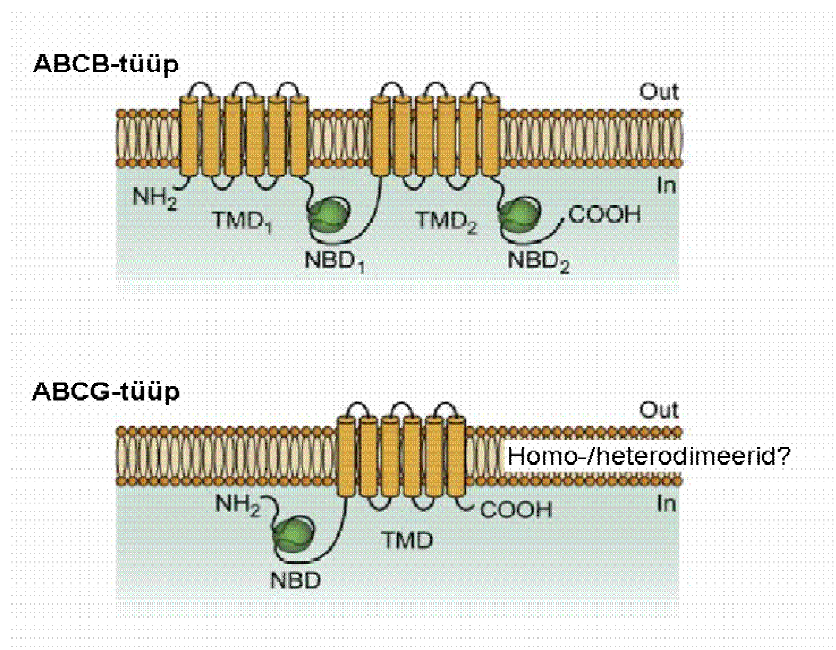
1.5 Faas III transporterid

Ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsiooni III faasis osalevate valkude hulka kuuluvad transporterid, mille ülesanne on detoksifikatsiooni esimesed kaks etappi edukalt läbinud ühendid rakust välja transportida. Toksiliste elektrofiilide moodustumise juures on kriitiliseks etapiks faas II süsteem. Kui faas II ensüümid ei ole võimelised edukalt konjugatsiooni läbi viima, võib kahjulike ühendite akumulatsioon rakus vähendada veelgi nende ensüümide detoksifikatsiooni aktiivsust. Ka seetõttu on oluline faas III valkude osalus faas II metaboliitide rakust välja transportimisel.

Faas III transporterid kuuluvad ABC (*ATP-binding cassette*) valkude superperekonda. Need transportervalgud kasutavad ATP energiat, et transportida oma substraat teisele poole membraani. Substraatidena on ABC valkude puhul näidatud suurt hulka erinevaid molekule (sealhulgas aminohappeid, süsivesikuid, lipiide, ksenobiootilisi ühendeid ning mitmeid ravimeid) (Dean *et al.*, 2001).

Kõik ABC transporterid omavad üldjuhul kahte nukleotiidi siduvat domääni (NBD – *Nucleotide Binding Domain*), mis on vajalikud ATP sidumiseks ja kahte transmembraanset domääni (TMD – *Transmembrane Domain*), mis vastutavad substraadispetsiifilisuse ja transpordi eest (Joonis 5) (Dean *et al.*, 2001). Transmembraanne osa on ABC transporterite valkudel üsna erinev, mis seletab ka laia substraadispektrit (Wakabayashi *et al.*, 2006).

Faas III valkude transpordimehhanismi kohta ei ole palju teada. Küsitav on näiteks seegi, kas substraadiga kontakteerumine toimub membraani lipiidse faasis ja kui see on nii, siis kas ühendi eemaldamine toimub väljaspool olevasse vesifaasi (“hüdrofoobse tolmuimeja” mudel) või toimetatakse substraat lihtsalt *flip-flop* viisil tsütosoolipoolsest lipiidsest kihist välisesse lipiidse kihti (flipaasi mudel) (Pastan&Gottesman, 1991, Higgins&Gottesman, 1992, del Moral *et al.*, 1998). Ilmselt on võimalikud mõlemad variandid ning see, kumb kasutusel on, oleneb substraadi suurusest ning hüdrofoobsusest (Sarkadi *et al.*, 2006).



Joonis 5. Erinevat tüüpi transporterite topoloogia mudelid. Üldjuhul omavad need valgud kahte transmembraanset domääni (TMD), ning kahte ATP-siduvat domääni (NBD). ABCG2-tüüpi transporterite puhul on näidatud vaid ühe ATP-siduva domääni ja ühe transmembraanse domääni olemasolu. Siiani teadaolevalt on ABC transporterite minimaalseks aktiivsuseks vajalik kahe TMD ja ATP olemasolu. Ei ole täpselt teada, kas need valgud esinevad aktiivses olekus homo- või heterodimeerina (Sarkadi *et al.*, 2006).

Põhilised ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsiooni III faasis osalevad valgud on ABCB1 geeni produkt P-glükoproteiin, ABCG2 (*ATP-binding cassette transporter G2*), MRP1 ja MRP2 (*Multidrug resistance-associated protein-1 ja 2*, vastavalt), millest esimene on seoses keskkonnatoksikantidega ilmselt kõige rohkem uuritud (Leslie *et al.*, 2005). Nii ongi AhR signaalirajast sõltuvat kaudset faas III transporterite aktivatsiooni demonstreeritud ABCB1 geeni induktsiooni näitel (Burt&Thorgeirsson, 1988, Fardel *et al.*, 1996). Faas I ja II poolt genereeritud 3-metüülkloorantreeni (3-MC) genotoksilised metaboliidid kahjustavad DNA-d, mis omakorda viib tuumorsupressorvalgu p53 stabiliseerumiseni ning viimase akumulatsioon indutseerib ABCB1 geeni ekspressiooni (Mathieu *et al.*, 2001). ABCG2 aktiveerimist AhR või AhR ligandide mõjul demonstreerisid Ebert ja kolleegid (2005), kuid kokkuvõttes ei ole teiste faas III transporterite regulatsiooni kohta palju teada (Ebert *et al.*, 2005).

Larriba ja kolleegid näitasid oma töös, et testikulaarses koes ekspresseeritakse P-glükoproteiini, kuid üldiselt on ABC superperekonna funktsioneerimise kohta selles koes vähe teada (Larriba *et al.*, 2001). P-glükoproteiini ekspressiooni on näidatud ka kapillaare ümbritsevas endoteelis, Sertoli rakkudes ja haploidsetes spermatiidides (Larriba *et al.*, 2001, Melaine *et al.*, 2002). Fakt, et mitootilistes ja meiotilistes sugurakkudes selle valgu

ekspressiooni täheldatud ei ole, võib viidata nende rakkude erakordsele sensitiivsusele toksiliste ühendite suhtes (Melaine *et al.*, 2002).

Ülimalt tundlikud koed, nagu aju ja testised on kaitstud vere-koebarjääriga ning nendes on transporteritel ühendite väljaviimises eriline roll. Näiteks on ABCB1 *knock-out* hiirtega näidatud selle geeni poolt kodeeritava transporteri substraatide kuni kaks korda suuremat akumul eerumist ajus (Schinkel, 1997). Seega pakutakse, et ABCB1-tüüpi pumbad on eriti aktiivsed just veri-kude barjääris ajus ning ka testises (Schinkel&Jonker, 2003). Kuna nende transporterite substraadid on hüdrofoobsed, on nad võimelised endoteelirakkudesse ja sealt edasi difundeeruma. Viidates ABCB1 transporterite kõrgele esinemissagedusele endoteelis aga spekul eerivad Schinkel ja Jonker (2003), et ilmselt toimub tänu sellele veri-kude barjääris sisenevate hüdrofoobsete ühendite kiire tagasipumpamine verre. See omakorda hoiab ksenobiootiliste ühendite kontsentratsiooni vastavas koes madalal. Pumba puudmisel võib substraadi kuhjumine aga toimuda isegi kuni 100-korda rohkem normaalsest (Schinkel&Jonker, 2003). Seega, toetudes eelnevale võiks arvata, et iga muutus valgus, mis mõjutab transporteri aktiivsust/funktsioneerimist omab efekti ka näiteks mehe reproduktiivsüsteemile.

Siiski, võrreldes faas I ja faas II ensüümidega ei oma faas III valkude (eelkõige P-glükoproteiini) puudumine organismile kuigi suurt mõju. Nii on nende valkude *knock-out* katseloomad praktiliselt täiesti terved ning ei näi omavat mingeid patoloogilisi muutusi normaalses elukeskkonnas. Samas on näidatud, et need loomad on eriti tundlikud mitmesugustele ksenobiootilistele ühenditele ja ravimitele (Sarkadi *et al.*, 2006).

1.6 Geneetiline varieeruvus detoksifikatsioonikaskaadi geenides

On täheldatud, et indiviidide vahel eksisteerib suur varieeruvus aktiveeritud AhR võimes konkreetsete sihtmärkgeenide ekspressiooni indutseerida. Põhjuseks peetakse siinkohal geneetilist varieeruvust AhR, AhRR ning ARNT valke kodeerivates geenides (Harper *et al.*, 2002). Uuritud on erinevaid polümorfisme näiteks kopsuvähi ning muude kopsuhaiguste ja endometrioosi patsientidel, kuid seost leitud pole (Kawajiri *et al.*, 1995, Cauchi *et al.*, 2001, Dialyna *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2001, Tsuchiya *et al.*, 2005). Assotsiatsioonile AhR signaaliraja polümorfismide ja mehe reproduktiivprobleemide vahel on viidatud aga mitmes töös (Watanabe *et al.*, 2004, Soneda *et al.*, 2005).

Nii faas I kui faas II ensüümid aga samuti ka faas III transporterid ekspresseeruvad põhiliselt maksas ja soolestikus, samuti kopsudes, sest suurem osa inimese organismi sattuvatest ksenobiootilistest ühenditest siseneb just sissehingamisel või toiduga ning mainitud organid on esmased kohad nende ühendite detoksitseerimisel. Viimane on ka põhjuseks, miks

enamasti räägitakse faas II ensüümide polümorfismide puhul patoloogiatest just maksas, soolestikus ning kopsudes (Nebert&Russell, 2002).

Suuremat osa neist ensüümidest ning neid kodeerivatest geenidest on uuritud ka seoses ravimite toksilisuse ja efektiivsusega ning vähiga (Guengerich, 2003, Reszka *et al.*, 2006). Detoksifikatsioonensüümide substraatidest moodustavad suure osa eksogeensed ühendid. Elimineerimisprotsessis võidakse need ühendid kantserogeensesse või mõnel muul kujul rakule kahjulikku vormi konverteerida ning lõppkokkuvõttes võib tulemuseks olla näiteks rakkude ebanormaalne proliferatsioon. Selline olukord võib olla põhjustatud substraadi pro-kantserogeensest iseloomust. Teisest küljest võib ensüümide aktiivsust/efektiivsust suuresti mõjutada ka geneetiline varieeruvus neid kodeerivates geenides. Polümorfisme peetaksegi kõige tõenäolisemaks põhjuseks indiviidide erinevas vastuvõtlikkuses keemilistele ühenditele (Reszka *et al.*, 2006).

Seoses (mehe) reproduktiivsusega on kõnealuseid ensüüme suhteliselt vähe uuritud. Siiani on piirdutud põhiliselt detoksifikatsioonensüümide ekspressiooni uurimisega suguorganites. Sama kehtib ka faas III valkude suhtes. Suurem osa töödest kirjeldab ekspressiooni loomudelitel, üksikud hilisemad ka inimese näitel (Lee&Nagayama, 1980, DiBiasio *et al.*, 1991, Rubin *et al.*, 1999, Larriba *et al.*, 2001, Rockett *et al.*, 2004).

Ka geneetilist varieeruvust seoses mehe reproduktiivprobleemidega on detoksifikatsioonikaskaadi geenides uuritud vaid väheste puhul. GST ensüümide ulatuslik ekspresseerumine testises (spermatogeensetes rakkudes, Sertoli ning Leydig rakkudes) on teinud need valgud üheks põhiliseks huviobjektiks viljatuse uurimisel. Suurem osa töödest keskendub siiski geenideletsiooni või väiksemate deletsioonide analüüsimisele infertiilsete patsientide grupis (Pajarinen *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2002, Aydemir *et al.*, 2007). Ühenukleotiidsete muutuste (SNP- *single nucleotide polymorphism*) seos viljatuse kujunemisega on olnud vaatluse all vaid ühes töös. Fritsche ja kolleegid (1998) on teadaolevalt ainukesed, kes on uurinud detoksifikatsioonensüümide geenides ühenukleotiidsete polümorfismide seost mehepoolse viljatusega. Antud töös leiti viljatusega seoses assotsiatsioon CYP1A1 geeni polümorfismiga (Fritsche *et al.*, 1998). Faas II ensüümide ning faas III transporterite polümorfisme infertiilsusega seoses analüüsitud ei ole.

Nagu eelpool toodust näha, ei ole detoksifikatsioonikaskaadi komponente seoses mehepoolse viljatuse kujunemisega eriti palju uuritud. Samas, kuna reproduktiivsüsteem on suhteliselt tundlik ksenobiootiliste ühendite suhtes ning arvestades mainitud ühendite laialdast levikut meie elukeskkonnas, võiks see valdkond aga üsna huvipakkuv olla ning vajaks edasist uurimist.

2. Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks oli genotüpiseerida idiopaatilise viljatusega patsiente ja terveid kontrollindiviide erinevate detoksifikatsioonisüsteemi geenide polümorfismide suhtes ning selgitada nende polümorfismide seos mehepoolse viljatuse kujunemises.

Käesolev töö teostati koostöös Tartu Ülikooli Kliinikumi Androloogiakeskusega.

3. Materjal ja metoodika

3.1. Patsiendid

Antud töös moodustasid patsientide grupi infertiilsed mitteobstruktiivse azoospermiaga või oligozoospermsed ($\leq 15 \times 10^6$ spermatoosoidi ml-s ejakulaadis) mehed (n=171). Kontrollgrupi moodustasid normaalsete spermaparameetritega terved mehed (n=212). Patsientide ja kontrollindiviidide vereproovid koguti Dr. Margus Punabi poolt TÜ kliinikumi Androloogiakeskuses ajavahemikus 2005-2006 ning DNA eraldati TÜ Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis. Nii patsiendid kui kontrollid läbisid TÜ Kliinikumi Androloogiakeskuses kliinilised uuringud, sealhulgas testiste suuruse mõõtmine Prader orhidomeetriga, hormoonide (FSH, LH ning testosteroon) taseme määramine ning spermaanalüüs lähtuvalt Maailma Tervishoiuorganisatsiooni (WHO - *World Health Organization*) standarditele (WHO, 1999). Uuringust jäeti välja patsiendid, kellel detekteeriti kromosoomihäired, Y kromosoomi mikroleletsioonid või epididümise ja/või *vas deferens* patoloogia.

Statistilise analüüsi jaoks jaotati patsientide rühma kaheks alarühmaks: oligozoospermiaga (n=126) ning azoospermiaga (n=45) mehed.

3.2 Polümeraasi ahelreaktsioon

Genoomne DNA eraldati 4 ml perifeersest EDTA verest, kasutades Anjabi ja Martinez (1997) poolt kirjeldatud sadestamismeetodit (Aljanabi&Martinez, 1997).

Käesoleva töö raames viidi polümeraasi ahelreaktsioon (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) läbi kahes osas:

1) PCR protokoll *AhR*, *AhRR* ning *ARNT* polümorfismide (Lisa 1) detekteerimiseks oli järgmine:

iga PCR-i reaktsioonisegu sisaldas 1,5 µl 10× reaktsioonipuhvrit B [800 mM Tris-HCl (pH 9,4-9,5), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween-20] (Solis BioDyne, Eesti); 2,5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne); 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (IBM Fermentas, Leedu); 0,06 µM alleelspetsiifilist praimerit, 0,5 µM mõlemat kontrollpraimerit (Tabel 1)(Invitrogen, USA), 1 U *Hot FirePol* ensüümi (Solis BioDyne); 30 ng genoomset DNA-d ning ddH₂O-d kuni lõppmahuni 15 µl.

Tabel 1. *AhR*, *AhRR* ning *ARNT* polümorfismide puhul kasutatud praimerite järjestused.

Geen	Polümorfism	Praimeri järjestus 5' - 3'
AhR	Arg554Lys (G>A)	Control F ^b GAAATTGGCAAGATAATACTGCACCG
		Control R ^c AAGGCACGAATTGGTTAGAGTTCC
		AS-A ^a GAAAAATTTTTCATTCTGCATGTGTT
		AS-G GAAAAATTTTTCATTCTGCATGTGTC
AhRR	Pro185Ala (C>G)	Control F TTA CTCTCGTCGGTGG AATAAAGTGTCT
		Control R CAGGACTGCAGCTCGTGGT
		AS-C AGGTGGTGT TTTGGGCAGC
		AS-G AGGTGGTGT TTTGGGCAGG
ARNT	Val189Val (G>C)	Control F TCTTATCGATGAACTACATTTAGG
		Control R GAAGCCTTGCCAGAGTCAAC
		AS-C CAGGCAGGG TGGTGTATGTC
		AS-G CAGGCAGGG TGGTGTATGTG

^aAS tähistab alleelspetsiifilist praimerit

^bControl F tähistab *forward* kontrollpraimerit

^cControl R tähistab *reverse* kontrollpraimerit

Amplifikatsioon viidi läbi PTC-200 PCR-i masinaga (MJ Research, Inc. Watertown, USA) järgnevatel tingimustel:

Algne denaturatsioon:	96°C	5 min	
Denaturatsioon:	96°C	1 min	}
Praimerite seondumine:	55°C/63°C/57°C*	30 sek	{ 32/35/32** tsüklit
Ekstensioon:	72°C	1 min	}
Lõpp-ekstensioon:	72°C	5 min	

*Praimerite seondumise temperatuur vastavalt *AhR*, *AhRR* ning *ARNT* polümorfismi puhul

**tsüklite arv vastavalt *AhR*, *AhRR* ning *ARNT* polümorfismi puhul

PCR produktid kontrolliti 2%-s agarosgeelis 0,5× TBE [(45 mM Tris-boraat; 1 mM EDTA-Na₂ (dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat))] puhvrvis.

2) PCR protokoll *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTA1*, , *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *SULT1A1*, *MDR1*, *ABCG2* polümorfismide (Lisa 1) genotüüpiseerimiseks oli järgmine: iga PCR-i reaktsioonisegu sisaldas 1 µl 10× reaktsioonipuhvrit B [800 mM Tris-HCl (pH 9,4-9,5), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2% w/v Tween-20] (Solis BioDyne); 2,5 mM MgCl₂ (Solis BioDyne); 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,2 mM dTTP ja 0,05 mM dUTP (IBM Fermentas); 10 pmol *forward* ja *reverse* praimerit (Metabion, SLV), 1 U *Hot FirePol* ensüümi (Solis BioDyne); 30 ng genoomset DNA-d ning ddH₂O-d kuni lõppmahuni 10 µl.

PCR praimerid saadi valmisplatvormina firmast AsperBiotech (Eesti).

Amplifikatsioon viidi läbi PTC-225 (MJ Research, Inc.) ning PrimusHT (MWG AG Biotech, SLV) PCR-i masinatega järgnevatel tingimustel:

algne denaturatsioon:	95 °C	15 min	
denaturatsioon:	95°C	20 sek	}
praimerite seondumine:	66°C	30 sek	} 9 tsüklit (temperatuuri langus tsükli
ekstensioon:	72°C	35 sek	} kohta 1°C)
denaturatsioon:	95°C	20 sek	}
praimerite seondumine:	56°C	30 sek	} 18 tsüklit
ekstensioon:	72°C	35 sek	}
denaturatsioon:	95°C	20 sek	}
praimerite seondumine:	54°C	30 sek	} 14 tsüklit
ekstensioon:	72°C	35 sek	}
Lõpp-ekstensioon:	72°C	7 min	

PCR produktid kontrolliti 1,5%-s agarosgeelis 0,5× TBE [(45 mM Tris-boraat; 1 mM EDTA-Na₂ (dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat)] puhvris.

3.3 Mutatsioonide detekteerimine

- 1) Polümorfismide *AhR* Arg554Lys, *AhRR* Pro185Ala ning *ARNT* Val189Val korral kasutati variatsioonide detekteerimiseks alleelspetsiifilist PCR-i (AS-PCR). Genotüpiseerimine korraldati sekveneerimisega 32 juhuslikult valitud proovi puhul.
- 2) Polümorfismide puhul geenides *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *SULT1A1*, *MDR1*, *ABCG2* (Lisa 1) kasutati genotüpiseerimiseks oligonukleotiidmaatriksil põhinevat praimerekstensiooni (APEX - *Arrayed Primer Extension*). DNA järjestuse määramise põhietapid APEX meetodil on PCR reaktsiooniga amplifitseeritud materjali puhastamine ja kontsentreerimine, DNA fragmenteerimine, APEX reaktsioon ning signaali detekteerimine ja analüüs (Kurg *et al.*, 2000).

3.3.1. Sekveneerimine

AS-PCR tulemuse kontrollimiseks sekveneeriti juhuslikult valitud 10, 12 ja 10 proovi vastavalt *AHR*, *AHRR* ja *ARNT* polümorfismide puhul.

PCR praimeritest ning didesoksünukleotiididest (dNTP) puhastamiseks töödeldi PCR produkte enne sekveneerimist 1 U eksonukleas I-ga (MBI Fermentas) ning 1,5 U kreveti aluselise fosfataasiga (SAP - *shrimp Alkaline Phosphatase*) (MBI Fermentas). Reaktsioonisegu inkubeeriti PTC-200 PCR-i masinas (MJ Research, Inc.) 20 min 37°C juures. Sellele järgnes ensüümi inaktivatsioon 80°C juures 15 min.

Iga sekveneerimisega sisaldas 5 pmol sekveneerimispraimerit, 4 µl DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit reagentide segu (GE Healthcare, USA), 1,5–3 µl puhastatud PCR produkte ning ddH₂O-d kuni lõppmahuni 10 µl.

Sekveneerimisreaktsioon viidi läbi järgmistel tingimustel:

denaturatsioon:	95°C, 30 sek	}
praimerite seondumine:	50°C, 15 sek	} 40 tsüklit
elongatsioon:	60°C 1min	}

Kõik proovid sekveneeriti mõlemalt ahelalt. Sekveneerimisreaktsioonis saadud fragmendid lahutati ABI Prism™ 377 DNA sekvenaatoriga (Applied Biosystems, USA) kasutades ReproGel 377 geeli (Amersham Biosciences, USA). Tulemused analüüsiti programmiga BioEdit version 7.0.5.3.

3.3.2 *Arrayed Primer Extension (APEX)*

3.3.2.1 PCR produktide ettevalmistamine APEX reaktsiooniks

PCR produktid koguti kokku 1,5 ml tuubi. Saadud kogus kontsentreeriti ja puhastati vabadest nukleotiididest, kasutades JetQuick PCR-i puhastuskolonne vastavalt valmistaja instruksioonidele (Genomed GmbH, SLV). Kontsentreeritud produktid elueeriti 30 µl ddH₂O-ga.

Amplifitseeritud produktide kasutamiseks APEX reaktsioonis fragmenteeriti produktid uratsiil-*N*-glükosülaasiga (UNG; MBI Fermentas) ning töödeldi kreveti aluselise fosfataasiga (MBI Fermentas). Ühes reaktsioonis kasutati 30 µl kontsentreeritud produkti, 1× UNG reaktsioonipuhvrit [50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 20 mM (NH₄)₂SO₄], 1,5 U UNG-i, 1 U sAP-i ning proove inkubeeriti 1 tund 37°C ja 10 min 95°C juures.

3.3.2.2 APEX reaktsioon ja signaalide detekteerimine

Käesolevas töös kasutatud DNA kiip töötati välja ning valideeriti Landi ja kolleegide poolt (Landi *et al.*, 2003). Antud DNA kiip valmistati firmas Asper Biotech Ltd.

Eelnevalt APEX reaktsioonile pesti klaasid kolm korda 2 min 95°C ddH₂O-ga. Reaktsioonisegu sisaldas 35 µl fragmenteeritud PCR-i produkte, 4 µl *ThermoSequenase* kontsentreeritud reaktsioonipuhvrit [260 mM Tris-HCl (pH 9,5), 65 mM MgCl₂] ja 0,875 µl (1,05 µl) *ThermoSequenase* lahjenduspuhvrit (GE Healthcare), erinevate fluorokroomidega märgistatud didesoksünukleotiidide segu [1 µl 50 µM Cy3-ddATP, 50 µM Cy5-ddGTP, 1,3 µl 50 µM TexasRed-ddCTP ja 1,1 µl 50 µM FL-12 ddUTP (Perkin-Elmer Life Sciences, USA)] ja 4 U *ThermoSequenase* DNA polümeraasi (GE Healthcare). Fragmenteeritud DNA denatureeriti 95°C juures 10 min, seejärel lisati *ThermoSequenase* reaktsioonipuhver, fluorestsentsmärgisega ddNTP segu ning *ThermoSequenase* DNA polümeraas. Seejärel kanti reaktsioonisegu pestud klaasile ja kaeti *LifterSlip*[®] katteklaasiga (Erie Scientific Company, USA). APEX reaktsioon viidi läbi 58°C juures 15 min. Pärast reaktsiooni pesti klaasid 2 min 0,3%-lise Alconox[®] lahusega (Alconox Inc., USA) ning lõpuks kolm korda 2 min 95°C ddH₂O-ga. Kuivatatud klaasile kanti fluorestseini kiire pleekumise vältimiseks *antifade*-reagenti (SlowFade[®], Molecular Probes, USA) ning kaeti seejärel katteklaasiga.

Signaalide detekteerimiseks kasutati Genorama[™] QuattroImager detektorit (Asper Biotech Ltd.), kus valgusallikaks on neli laserit ning signaal registreeritakse CCD kaameraga. Detekteeritud fluorestsentssignaalide asukohad kandjal visualiseeriti, kasutades Image Pro Plus[™] arvutiprogrammi (Media Cybernetics Inc., USA) ning analüüsiti Genorama[™]

arvutiprogrammiga, mis hindab signaalide tugevusi erinevates nukleotiidide kanalites ning võrdleb saadud tulemusi kontrolljärjestusega (referentsjärjestusega). Analüüsi käigus võrreldi signaalide intensiivsuseid erinevates kanalites ja määrati antud positsioonis lülitunud nukleotiid. Paralleelselt kasutati ka APEX reaktsioonil saadud slaidide andmebaasi kasutatavat programmi PicDBTM (Asper Biotech Ltd.), mille abil on üheaegselt võimalik võrrelda paljudel erinevatel indiviididel üht uuritavat positsiooni.

3.4 Andmete statistiline analüüs

Fenotüübiliste tunnuste võrdlemiseks patsientide ja kontrollide vahel kasutati Mann-Whitney U testi. Mann-Whitney test on mitte-parameetriline (*non-parametric*) test, mis hindab erinevusi kahe sõltumatu proovi vahel.

Genotüüpiseerimisandmete statistiline analüüs teostati programmiga R2.3.1 A Language and Environment (Free Software Foundation, Boston, USA) K. Halleri poolt (MD, Ph.D).

Iga SNP lookuse genotüüpide vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule kontrolliti programmiga Haploview (Version 3.3) (Barrett *et al.*, 2005). Alleelse jaotuvuse erinevuse määramiseks kontrollidel ja patsientidel kasutati χ^2 testi. Tulemuste tähendusrikkust hinnati P-väärtusega, mis kirjeldab tõenäosust, et tulemused on saadud juhuslikult. Statistiliselt oluliseks loeti P väärtust $< 0,05$.

Konkreetselt genotüübi mõju uurimiseks haigus-fenotüübile võrreldi omavahel genotüübigruppide esinemissageduse erinevust patsientide ning kontrollgrupis. Selleks kategoriseeriti ühe alleeli suhtes homsügootsed indiviidid ühte gruppi ning ülejäänud teise gruppi ning võrreldi iga grupi esinemissagedusi patsientidel ning kontrollidel.

Ka genotüüpide ning mehepoolse viljatuse vahelise assotsiatsiooni regressioonanalüüs teostati programmiga R2.3.1 A Language and Environment. Regressioonanalüüs võimaldab luua matemaatilise mudeli kirjeldamiseks tunnuste vahelisi seoseid. Regressioonanalüüsi puhul vaadeldakse üht tunnust kui sõltuvat ning uuritakse selle seost sõltumatute tunnustega, mille põhjal oleks võimalik kirjeldada ning ühtlasi ka prognoosida selle sõltuva tunnuse väärtusi. Kirjeldav mudel ning prognoos on seda täpsem, mida tugevamini sõltumatu(d) tunnus(ed) sõltuva tunnusega seotud on. Regressioonanalüüsil on mitmeid erinevaid metoodilisi variatsioone sõltuvalt kasutada olevate tunnuste tüübist ning jaotuse parameetritest. Käesolevas töös kasutati logistilist ning Poissoni regressiooni.

Genotüübi efekti haigusfenotüübile hinnati riskifaktoriga OR (*odds ratio*). OR näitab teatud sündmuse (antud juhul genotüübi) esinemissageduste erinevusi patsientide ja kontrollindiviidide seas ning arvutatakse jagades sündmuse esinemise patsientidel sündmuse

esinemisega kontrollindiviidide rühmas. Saadud riskifaktori väärtust tõlgendatakse sõltuvalt 95% usaldusväärsuse intervallist (*confidence interval*, C.I. – riskifaktori väärtuste vahemik, kuhu paiknevad 95% saadud riskifaktori väärtustest) ja konkreetsest haigusfenotüübist. Analüüsil saadavat riskifaktori väärtust ja sellega seostatavat genotüübi efekti statistilist tähendusrikkust hindava χ^2 p-väärtust saab pidada statistiliselt usaldusväärseks ainult siis, kui usaldusväärsuse intervalli sisse ei jää OR väärtust 1,0.

Antud töös klassifitseeriti OR väärtus järgmiselt:

OR<1 genotüüp omab protektiivset efekti haigusele,

OR>1 genotüüp on seotud vastuvõtlikkusega antud haiguse suhtes, tegemist on nn riskigenotüübiga.

Linkage disequilibrium (LD) ning haplotüübianalüüsiks kasutati programmi Haploview. Analüüsiti geenisiseseid aheldunud lookuspaarid uuringugrupi ühendrühmas (patsiendid + kontrollid). LD määra hinnati lähtuvalt D' ja r^2 väärtustest. Tulemus, kus $D' = 1$ kirjeldab olukorda, kus kahe markeri vahel ei ole ajalooliselt rekombinatsiooni toimunud. Antud töös klassifitseeriti LD analüüsi tulemused järgmiselt:

$D' > 0.9$ kaks polümorfismi on täielikult aheldunud (absoluutne $D' = 1$)

$D' = 0.8 - 0.9$ polümorfismid on aheldunud

r^2 on korrelatsioonikoeffitsient, mis hindab kahe lookuse vahelise assotsiatsiooni kõrvalekallet. Kui $r^2 = 1$, siis see tähendab, et uuritavad SNP-d päranduvad alati koos, on täielikus ahelduses. Tavaliselt võetakse r^2 piiriks 0.8, see tähendab, et 80% juhtudest päranduvad SNP-d koos.

4. Tulemused

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli genotüpiseerida assotsiatsiooniuuringu raames mehepoolse viljatusega patsiente ning terveid kontrollindiviide, et leida haigusseoselisi markereid detoksifikatsiooniprotsessides osalevate valkude geenidest.

Antud töös uuriti kokku 171 idiopaatilise viljatusega patsienti ning 212 tervet meest. Erinevates uuringutes ning erinevate polümorfismide puhul indiviidide koguarv varieerub (Lisa 2).

4.1 Kliinilised andmed

Kliiniliste analüüside tulemused on toodud Tabelis 2. Ootuspäraselt iseloomustas patsiente võrreldes tervete meestega madalam keskmine testikulaarne maht ning märkimisväärselt halvem sperma kvaliteet (seemnerakkude kontsentratsioon ja progressiivne liikuvus). Ka oli patsientide keskmine vanus kõrgem kui kontrollidel ($31\pm SD$ vs $18\pm SD$). Hormoonanalüüsid näitasid infertiilsete patsientide puhul võrreldes kontrollidega kõrgeenenud seerumi gonadotropiinide (FSH ja LH) taset. Testosterooni tase oli patsientidel madalam kui tervetel indiviididel.

Tabel 2. Kliiniliste analüüside tulemused.

	Patsiendid (n = 171)			Kontrollid (n = 212)			P väärtus
	Median	Minimum	Maximum	Median	Minimum	Maximum	
Vanus	31.0	20.0	49.0	18.0	17.0	25.0	< 0.001
Keskmine testikulaarne maht (mL)	18.5	3.0	50.0	26.0	15.0	45.0	< 0.001
Ejakulaadi ruumala (mL)	3.7	0	10.2	3.2	0.9	8.9	N.S.
Sperma kontsentratsioon (10^6/mL)	1.0	0	14.0	122.0	75.0	716.0	< 0.001
Spermide A + B liikuvus	16.5	0	74.0	58	32	80	< 0.001
Seerumi FSH (IU/L)	8.8	1.3	62.6	3.1	0.7	9.3	< 0.001
Seerumi LH (IU/L)	4.5	0.6	115	2.9	0.9	10.2	< 0.001
Seerumi testosteroon	16.9	3.5	49.2	20.6	10.9	48.6	< 0.001

N.S tähistab statistiliselt mitteolulist tulemust.

4.2 Genotüpiseerimise tulemused

Käesoleva magistritöö raames genotüpiseeriti alleelspetsiifilise PCR-ga 324 indiviidi (geenid AhR, AhRR ning ARNT) ja APEX meetodiga 287 indiviidi (geenid *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *SULT1A1*, *MDR1*, *ABCG2*). Töös uuritud ksenobiootiliste ühendite detoksifikatsioonis osalevate ensüümide geneetilised variatsioonid olid valitud APEX kiibile Landi ja kolleegide poolt ning peegeldasid 2003. aasta valikut teadaolevatest polümorfismidest (Landi *et al.*, 2003).

Antud töösse valiti kiibilt SNP-d geenidest, mille produktid osalevad AhR ligandide poolt aktiveeritavas detoksifikatsioonikaskaadis. SNP-de valikul lähtuti variatsiooni positsioonist geenis, töösse valiti kodeerivas alas olevad polümorfismid. Kokku analüüsiti antud töö raames 28 polümorfismi 15 geenist (Lisa 1). Genotüpiseerimise analüüsi tulemused on toodud järgnevas tekstis.

Lookuste genotüüpse jaotuvuse vastavust Hardy-Weinbergi tasakaalule arvutati programmiga Haploview 3.3. Vaadeldi vaid kontrollrühma indiviide, kuna patsientide hulgas võibki HW tasakaal olla nihkunud. Lookused ($n = 5$), mille genotüüpne jaotuvus ei vastanud HW tasakaalule ($p < 0.05$), eemaldati edaspidisest uuringust.

Kõrvalekallete põhjuseks võis olla mittekorrektne heterosügootide detekteerimine genotüpiseerimisel. Antud töös võib see olla tingitud APEX reaktsiooni tulemuste analüüsimisel võimalike homosügootide lugemisest heterosügootide hulka või vastupidi. Homosügootide (*wild-type* või mutantsed homosügootid) vähesus kontrollindiviidide grupis võib olla tõene tulemus juhul, kui antud lookus on selektsiooni all ja eelistatud on heterosügootid.

4.2.1 Geneetilised variatsioonid *AhR*, *AhRR* ja *ARNT* geenides

Käesolevas töös analüüsiti mittesünonüümseid muutusi *AhR* ning *AhRR* geenides - Arg554Lys, Pro185Ala vastavalt, ning Val189Val sünonüümset polümorfismi *ARNT* geenis. Saadud alleelisagedusi ning genotüüpe võrreldi 112 patsiendi ja 212 kontrolli vahel. Alleelisageduste võrdlus näitas *AhRR* Ala (G) alleeli kõrgemat esinemissagedust patsientide hulgas võrreldes kontrollidega ($P=0.026$) (Tabel 3). *AhR* Arg554 ja Lys554 ning *ARNT* Val189 (G-alleel) ja Val189 (C-alleel) alleelsed sagedused ei omanud statistiliselt olulist erinevust võrdlusgruppides.

Tabel 3. *AhR*, *AhRR* ning *ARNT* polümorfismide genotüpiseerimise tulemused.

Alleeli ja genotüübi sagedused	Polümorfism	Patsiendid % (n)	Kontrollid % (n)	OR, P väärtus
AHR: Arg554Lys				
Alleeli sagedused	G (Arg)	0.94	0.91	N.S. ^a
	A (Lys)	0.06	0.09	
	G/G ^b	87.3 (96)	82.9 (175)	
Genotüübi sagedused	G/A	12.7 (14)	17.1 (36)	N.S.
	A/A	-	-	
AHRR: Pro185Ala				
Alleeli sagedused	C (Pro)	0.49	0.58	0.026 ^a
	G (Ala)	0.51	0.42	
	C/C + C/G ^b	68.5 (76)	82.0 (173)	
Kombineeritud genotüübi sagedused	G/G	31.5 (35)	18.0 (38)	2.10, 0.006
	C/C ^b	29.7 (33)	34.6 (73)	
	C/G + G/G	70.3 (78)	65.4 (138)	
ARNT: Val189Val				
Alleeli sagedused	G	0.68	0.67	N.S. ^a
	C	0.32	0.33	
	G/G + G/C ^b	90.0 (100)	87.2 (184)	
Kombineeritud genotüübi sagedused	C/C	10.0 (11)	12.8 (27)	N.S.
	G/G ^b	45.0 (50)	47.4 (100)	
	G/C + C/C	55.0 (61)	52.6 (111)	

NS tähistab statistiliselt mitteolulist tulemust

^a P väärtus, χ^2 test;

^b referentsgrupp

Kombineeritud genotüübianalüüsil (Pro/Pro + Pro/Ala vs Ala/Ala) ilmnes *AhRR* Ala/Ala genotüübi kõrgem esinemissagedus patsientide seas (OR=2.10; P=0.006). Edasine *AhRR* geeni Pro185Ala lookuse analüüs näitas Ala/Ala alleeli sagedasemat esinemist azoospermiaga meestel. Patsientide vanuse ja testiste mahu järgi kohandatud logistilise regressiooni mudel näitas seost *AhRR* Ala/Ala genotüübi ja azoospermia vahel (kohandatud OR=2.49, P=0.041). Sarnaselt alleelsele jaotuvusele ei täheldatud erinevust *AhR* Arg554Lys ja *ARNT* Val189Val (G-/C-alleel) lookuse genotüübisagedustes kontrollide ja patsientide vahel.

4.2.2 Geneetilised variatsioonid faas I detoksifikatsiooniensüümide (*CYP1A1*, *CYP1A2* ja *CYP1B1*) geenides

CYP1A1, *CYP1A2* ja *CYP1B1* geenides uuritud polümorfismid ning vastav indiviidide arv on toodud Lisas 2. Kaheksast uuritud lookusest ei vastanud kontrollide puhul HW tasakaalule üks (*CYP1B1* geeni Ala>Ser muutus koodonis 119). Genotüpiseerimistulemused on toodud Tabelis 4.

Alleelisageduste võrdlemisel kontrollide ja patsientide vahel saadi statistiliselt tähendusrikas assotsiatsioon *CYP11B1* geeni Arg48Gly (C>G) polümorfismi puhul. Antud juhul esines patsientidel kontrollidest rohkem Arg (C) alleeli ($P=0.035$). Genotüüpide kombineerimisel (Gly/Gly + Gly/Arg vs. Arg/Arg) ilmnis tendents Arg/Arg genotüübi sagedasemale esinemisele patsientide seas ($OR=1.61$, $P=0.053$). Regressioonianalüüs näitas Arg/Arg genotüübi sageduse selget tõusu suunas kontrollid $\rightarrow$ oligozoospermiaga patsiendid $\rightarrow$ azoospermiaga patsiendid [43.83% (71/162) (95% CI: 36.12 - 51.83) $\rightarrow$ 51.76% (44/85) (95% CI: 40.73 - 62.64) $\rightarrow$ 76.92% (20/26) (95% CI: 55.92 - 90.25)] (Poissoni regressioon, $OR=1.55$, $P=0.0106$). Erinevate patsientidegrupi võrdlemisel kontrollidega ilmnis oluline erinevus kontrollide ja azoospermiaga patsientide vahel (logistiline regressioon, $OR=4.27$, $P=0.0031$).

Käesolevas töös *CYP11B1* geenis uuritud lookused olid omavahel suuremal või vähemal määral aheldatuses, kuid ühtegi haploblokki ei moodustanud (kriteeriumiks, et $r^2 > 0.8$). Erinevate *CYP11B1* lookuste alleelide kombineerimisel saadi patsiente ja kontrole võrreldes statistiliselt oluline tulemus Arg48Gly ning Leu432Val lookuste moodustatud haplotüübiga. Antud haplotüübi puhul esines patsientidel võrreldes kontrollidega sagedamini ArgLeu (CC) kombinatsiooni (0.4 vs 0.29 vastavalt) ($OR=2.6$; permutatsioonitesti järgselt $P=0.03$).

Ülejäänud kuue lookuse alleeli- ja genotüübisageduste korral statistiliselt tähendusrikast erinevust infertiilsete meeste ja kontrollide vahel ei leitud.

Tabel 4. Faas I polümorfismide genotüpiseerimise tulemused.

Alleeli- ja genotüübisagedused	SNP	Patsiendid % (n)	Kontrollid % (n)	OR, P väärtus
CYP1A1: Ile462Val				
Alleelisagedus	A (Ile)	0.96	0.96	N.S. ^a
	G (Val)	0.04	0.04	
	AG + GG	7.8 (9)	7.9 (13)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	AA ^b	92.2 (107)	92.1 (152)	N.S.
	GG	0.9 (1)	0.6 (1)	
	AA+AG ^b	99.1 (115)	99.4 (164)	N.S.
CYP1A1: Asn461Thr				
Alleelisagedus	A (Asn)	0.004	0.01	N.S. ^a
	C (Thr)	0.996	0.99	
	C/C ^b	99.1 (116)	98.2 (163)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	A/C	0.9 (1)	1.8 (3)	
	A/A	-	-	-
	CYP1A2: Asn516Asn			
Alleelisagedus	T	0.59	0.63	N.S. ^a
	C	0.41	0.37	
	T/C + T/T	80.9 (92)	84.6 (137)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/C ^b	19.1 (22)	15.4 (25)	
	T/T	36.5 (42)	41.4 (67)	N.S.
	T/C + C/C ^b	63.5 (72)	58.6 (95)	
CYP1B1: Arg48Gly				
Alleelisagedus	C (Arg)	0.76	0.67	0.035 ^a
	G (Gly)	0.24	0.33	
	G/G + G/C ^b	44.3 (51)	56.2 (91)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/C	55.7 (64)	43.8 (71)	1.61, 0.053
	G/G ^b	4.3 (5)	9.9 (16)	
	G/C + C/C	95.7 (110)	90.1 (146)	N.S.
CYP1B1: Leu432Val				
Alleelisagedus	C (Leu)	0.64	0.62	N.S. ^a
	G (Val)	0.36	0.38	
	G/G + G/C	57.5 (65)	59.9 (94)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/C ^b	42.5 (48)	40.1 (63)	
	G/G	14.2 (16)	15.9 (25)	N.S.
	G/C + C/C ^b	85.8 (97)	84.1 (132)	
CYP1B1: Asp449Asp				
Alleelisagedus	C	0.65	0.62	N.S. ^a
	T	0.35	0.38	
	T/T + T/C	55.2 (64)	59.9 (97)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/C ^c	44.8 (52)	40.1 (65)	
	T/T	15.5 (18)	15.4 (25)	N.S.
	T/C + C/C ^c	84.5 (98)	84.6 (137)	
CYP1B1: Asn453Ser				
Alleelisagedus	A (Asn)	0.84	0.87	N.S. ^a
	G (Ser)	0.16	0.13	
	A/G + G/G	27 (30)	25.5 (41)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	A/A ^b	73 (81)	74.5 (120)	
	G/G	4.5 (5)	1.2 (2)	N.S
	A/A + A/G ^b	95.5 (106)	98.8 (159)	

NS tähistab statistiliselt mitteolulist tulemust

^a P väärtus, χ^2 test;

^b referentsgrupp

4.2.3 Geneetilised variatsioonid faas II detoksifikatsiooniensüümide (*SULT1A1*, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *EPHX1*) geenides

Faas II detoksifikatsiooniensüümide geenides uuritud polümorfismid ning analüüsitud patsientide ning kontrollide arv on toodud Lisas 2. Hardy-Weinbergi tasakaalule ei vastanud *GSTP1* Ile105Val, *GSTM1* Lys173Asn ning *SULT1A1* His213Arg lookused.

Genotüpiseerimisanalüüsi tulemused on toodud Tabelis 5. Statistiliselt oluline erinevus ilmnis alleelisageduste võrdlemisel *NQO1* Arg139Trp (C>T) polümorfismi korral, kus Trp alleel esines sagedamini patsientidel (P=0.002). Sama lookuse genotüüpide kombineeritud analüüsil (Trp/Trp + Trp/Arg vs Arg/Arg) ilmnis, et Trp139 alleeli olemasolu (nii homo- kui heterosügootses vormis) on tugevaks riskiks viljatusele (OR=3.21, P=0.0015). Regressioonanalüüs näitas Trp/Trp ja Trp/Arg genotüüpide esinemist eelkõige oligozoospermsete patsientide hulgas. Kui võrreldi kumbagi patsientide gruppi kontrollidega, siis oligozoospermiaga meeste ja kontrollide vahel ilmnis statistiliselt tähendusrikas erinevus (logistiline regressioon, OR=3.61, P=0.0008).

Tabel 5. Faas II polümorfismide genotüpiseerimise analüüsi tulemused.

Alleeli- ja genotüübisagedused	SNP	Patsiendid % (n)	Kontrollid % (n)	OR, P väärtus	
SULT1A1: Val223Met					
Alleelisagedus	A (Met)	0.99	0.997	N.S. ^a	
	G (Val)	0.1	0.003		
Genotüübi sagedus	AG	1.8 (2)	0.7 (1)	N.S.	
	AA ^b	98.2 (110)	99.3 (152)		
	GG	-	-		-
GSTA1: Cys112Ser					
Alleelisagedus	C (Cys)	0.54	0.62	N.S. ^a	
	G (Ser)	0.46	0.38		
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/G + G/G	63 (58)	58.5 (72)	N.S.	
	C/C ^b	37 (34)	41.5 (51)		
	G/G	28.3 (26)	17.1 (21)		1.91, 0.052
	C/G + C/C ^b	71.7 (66)	82.9 (102)		
GSTM3: Ile224Val					
Alleelisagedus	A (Ile)	0.30	0.36	N.S. ^a	
	G (Val)	0.70	0.64		
Kombineeritud genotüübi sagedus	G/G + A/G	90.1 (100)	83.4 (131)	N.S.	
	A/A ^b	9.9 (11)	16.6 (26)		
	G/G	49.5 (55)	43.9 (69)		N.S.
	A/A + A/G ^b	50.5 (56)	56.1 (88)		
GSTP1: Val114Ala					
Alleelisagedus	T (Val)	0.09	0.1	N.S. ^a	
	C (Ala)	0.91	0.9		
Kombineeritud genotüübi sagedus	T/C + T/T	15 (17)	18.4 (30)	N.S.	
	C/C ^b	85 (96)	81.6 (133)		
	T/T	0.9 (1)	1.2 (2)		N.S.
	T/C + C/C ^b	99.1 (112)	84.1 (161)		
NQO1: Pro187Ser					
Alleelisagedus	C (Pro)	0.85	0.8	N.S. ^a	
	T (Ser)	0.15	0.2		
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/T + T/T ^b	23.7 (27)	36.6 (60)	1.86, 0.023	
	CC	76.3 (87)	63.4 (104)		
	T/T	6.1 (7)	2.4 (4)		
	C/T + C/C ^b	93.9 (107)	97.6 (160)		
NQO1: Arg 139Trp					
Alleelisagedus	C (Arg)	0.89	0.96	0.002 ^a	
	T (Trp)	0.11	0.04		
Kombineeritud genotüübi sagedus	CT + TT	21.6 (25)	7.9 (13)	3.21, 0.0015	
	CC ^b	78.4 (91)	92.1 (152)		
	TT	0.9 (1)	-		NS
	CT + CC	0.91(114)	1 (165)		

<i>EPHX1</i>: Asp68Asp				
Alleelisagedus	C	0.01	0.015	N.S. ^a
	T	0.99	0.985	
Kombineeritud genotüübi sagedus	T/T ^b	98.3 (113)	97 (159)	N.S.
	T/C	1.7 (2)	3 (5)	
	C/C	-	-	
<i>EPHX1</i>: Tyr113His				
Alleelisagedus	C (His)	0.32	0.39	N.S. ^a
	T (Tyr)	0.68	0.61	
	T/C + C/C ^b	50.4 (57)	63 (102)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	T/T	49.6 (56)	37 (60)	1.67, 0.039
	C/C	14.2 (16)	14.8 (24)	
	T/T + T/C ^b	85.8 (97)	85.2 (138)	
<i>EPHX1</i>: His139Arg				
Alleelisagedus	A (His)	0.78	0.76	N.S. ^a
	G (Arg)	0.22	0.24	
	A/G + G/G	34.8 (40)	41.2 (68)	
Kombineeritud genotüübi sagedus	A/A ^b	65.2 (75)	58.8 (97)	N.S.
	G/G	8.7 (10)	7.3 (12)	
	A/A + A/G ^b	91.3 (105)	92.7(153)	

NS tähistab statistiliselt mitteolulist tulemust

^a P väärtus, χ^2 test;

^b referentsgrupp

Uuritud geenirühmas saadi veel kaks statistiliselt olulist tulemust. *NQOI* lookuse Pro187Ser (C>T) kombineeritud genotüüpide (Pro/Pro vs Pro/Ser + Ser/Ser) võrdlemisel patsientide ning kontrollindiviidide vahel ilmnes, et Pro/Pro genotüüpi esines sagedamini patsientidel, ning et Pro/Pro genotüüp on risk viljatusele (OR=1.86, P=0.023). Poissoni regressioon näitas selget Pro/Pro genotüübi sageduse tõusu suunas kontrollid → oligozoospermiaga patsiendid → azoospermiaga patsiendid [63.41% (104/164) (95% CI: 55.50 - 70.69) → 73.56% (64/87) (95% CI: 62.83 - 82.18) → 85.19% (23/27) (95% CI: 65.39 - 95.14)] (OR=1.62, P=0.0182).

EPHX1 Tyr113His (T>C) polümorfismi puhul osutus riskigenotüübiks Tyr/Tyr (OR=1.67, P=0.039). Statistiliselt piiripealne seos saadi *GSTAI* lookuse Cys112Ser (C>G) ning infertiilsuse kujunemise vahel. Antud juhul esines patsientide rühmas võrreldes kontrollidega veidi sagedamini Ser/Ser genotüüpi (OR=1.91, P=0.052).

Kummagi patsientidegrupi eraldi võrdlemisel kontrollidega, tuli välja Ser/Ser genotüübi sagedasem esinemine oligozoospermiaga patsientide hulgas (logistiline regressioon, OR=2.00, P=0.0496).

Ülejäänud polümorfismide puhul ei leitud statistiliselt tähendusrikast seost mehepoolse viljatusega.

4.2.4 Geneetilised variatsioonid faas III transporterite (*MDR1*, *ABCG2*) geenides

Faas III transporterite geenide polümorfismidest ei vastanud Hardy - Weinbergi tasakaalule üks lookus (*MDR1* Thr893Ala893Ser). Ülejäänud nelja polümorfismi puhul assotsiatsiooni viljatuse kujunemisega ei leitud (Tabel 6).

Tabel 6. Faas III transporterite polümorfismide genotüpiseerimisanalüüsi tulemused

Alleeli- ja genotüübisagedused	SNP	Patsiendid % (n)	Kontrollid % (n)	OR, P väärtus
<i>MDR1</i>: Ile1145Ile				
Alleelisagedus	C	0.44	0.4	N.S. ^a
	T	0.56	0.6	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/T + T/T	78.9 (90)	83.2 (134)	N.S.
	CC ^b	21.1 (24)	16.8 (27)	
	T/T	31.6 (36)	34.2 (55)	-
	C/T + C/C ^b	68.4 (78)	65.8 (116)	
<i>MDR1</i>: Gly412Gly				
Alleelisagedus	C	0.6	0.55	N.S. ^a
	T	0.4	0.45	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/T + T/T	58.8 (67)	67.5 (110)	N.S.
	C/C ^b	41.2 (47)	32.5 (53)	
	T/T	20.2 (23)	21.5 (35)	N.S.
	C/C + C/T ^b	79.8 (91)	78.5 (128)	
<i>ABCG2</i>: Lys141Gln				
Alleelisagedus	A (Lys)	0.11	0.1	N.S. ^a
	C (Gln)	0.89	0.9	
Kombineeritud genotüübi sagedus	C/A + A/A	18.1 (19)	17.6 (28)	N.S.
	C/C ^b	81.9 (86)	82.4 (131)	
	A/A	4.8 (5)	1.9 (3)	N.S.
	A/C + C/C ^b	95.2 (100)	98.1 (156)	
<i>ABCG2</i>: Met12Val				
Alleelisagedus	A (Met)	0.07	0.05	N.S. ^a
	G (Val)	0.93	0.95	
Kombineeritud genotüübi sagedus	A/A	-	-	N.S.
	G/G ^b	86.1 (99)	90.7 (146)	
	G/A	13.9 (16)	9.3 (15)	

NS tähistab statistiliselt mitteolulist tulemust

^a P väärtus, χ^2 test;

^b referentsgrupp

5. Arutelu

Spermakvaliteedi languse üheks peamiseks põhjuseks viimastel dekaadidel arvatakse olevat ksenobiootiliste ühendite üha ulatuslikum levik elukeskkonnas. Need keemilised ühendid võivad organismi sattuda nii toidu kui veega, samuti sissehingamisel ning häirida muuhulgas ka organismi hormonaalset tasakaalu (Toppari *et al.*, 1996). Suurem osa neist ühendeist on vastupidavad metaboolsele lagundamisele (peamiselt nende hüdrofoobsuse tõttu) ning akumulierudes toiduahelas omavad pidevat efekti nii loomade kui inimese tervisele (Mandal, 2005).

5.1 AhR signaalirada

AhR signaalirada on üks põhilisi teid, mille kaudu keskkonna toksikandid organismi mõjutada võivad. Kõigist organeist on reproduktiivsüsteem üks tundlikumaid mitmesugustele ksenobiootilistele ühenditele. Lisaks arvatakse, et polümorfismid AhR, AhRR ning ARNT geenides võivad olla põhjuseks, miks indiviidide vahel on nii erinev vastus keskkonnatoksikantidele ning miks mõned on nende ühendite toksilistele efektidele vastuvõtlikumad.

Seetõttu on AhR signaalirajaga seotud polümorfismide uurimine seoses viljatusega viimasel ajal teadlaste huviorbiiti tõusnud (Watanabe *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2004, Soneda *et al.*, 2005, Guo, 2006).

AhR signaaliraja komponentide - AhR, AhRR, ARNT geenides on kodeerivas alas leitud suhteliselt vähe polümorfisme. Lisaks on osade polümorfismide puhul täheldatud ka populatsioonispetsiifilist esinemist (Wong *et al.*, 2001). Võimalik, et madal polümorfismus neis geenides viitab suhteliselt madalale tolerantsusele geneetilise varieeruvuse suhtes.

Kolmest käesolevas töös vaadeldud AhR signaaliraja polümorfismist (*AHRR* Pro185Ala, *AhR* Arg554Lys, *ARNT* Val189Val) leiti assotsiatsioon viljatuse kujunemisega esimese puhul. AhRR geeni koodonis 185 olevat muutust (C>G) on eelnevalt uuritud seoses endometrioosi ja kopsuvähiga, kuid assotsiatsiooni nende patoloogiatega näidatud ei ole (Watanabe *et al.*, 2001, Cauchi *et al.*, 2003).

Antud uurimistöös saadud tulemused viitavad selle mittesünonüümse muutuse võimalikule seosele mehepoolse viljatuse kujunemisega. Need tulemused kinnitavad ka eelnevate uuringutega näidatud seost *AHRR* Pro185Ala polümorfismi ning reproduktiivtervise halvenemise eelsoodumusega meestel (Watanabe *et al.*, 2004). Samuti on varasemates

uuringutes leitud statistiliselt oluline seos Pro185Ala lookuse ning mikropeenise esinemise vahel (Fujita *et al.*, 2002, Soneda *et al.*, 2005).

Erinevalt mainitud töödele, kus mehepoolse viljatuse ning väliste suguelundite anomaaliaga leiti olevat seotud Pro185 (C) alleel, näitasid käesolevas töös saadud tulemused Ala185 (G) alleeli sagedasemat esinemist infertiilsetel patsientidel. Seega, Pro/Pro ning Pro/Ala genotüübid võivad omada kaitsvat funktsiooni mehepoolse infertiilsuse tekke vastu ning Ala/Ala genotüübiga indiviididel seevastu on suurem tõenäosus mehepoolse viljatuse kujunemiseks. Lisaks ilmnes, et azoospermiaga indiviididel esines oligozoospermiaga patsientidest rohkem Ala/Ala genotüüpi, mis võib peegeldada selle genotüübi kaalukamat mõju viljatuse kujunemisel.

Põhjus, miks ilmnes selline lahknevus antud töö ning Watanabe ja kolleegide (2004) saadud tulemuste vahel, ei ole selge (Watanabe *et al.*, 2004). Võimalik, et selle tekkepõhjuseks oli erinevus uuringugruppides. Kui patsientide grupi selektsioonikriteeriumid olid mõlema töö puhul samad, siis kontrollgrupi valikus ilmnesid mõned erinevused. Käesolevas töös toetus kontrollide valik spermaparameetrite analüüsitulemustele. Siinkohal tuleks siiski märkida kontrollide ning patsientide grupi vanuste erinevust, mis võib olla ka üheks tulemusi mõjutavaks faktoriks.

Watanabe ja tema kolleegide (2004) uuringus koosnes kontrollindiviidide grupp „tõestatud fertiilsusega“ meestest. Samas puudus aga konkreetne informatsioon nende meeste sperma kvaliteedi kohta. Lisaks oli Watanabe ja kolleegide (2004) kontrollgrupis indiviidide arv ligi kaks korda väiksem käesolevas töös uuritud kontrollgrupist.

Struktuurilt on AhR signaaliraja valgud sarnased, kuid tulenevalt nende spetsiifilisest funktsioonist esinevad ka mõned erinevused. Sarnaselt AhR valguga on repressoris olemas bHLH ning PAS-A domään, kuid PAS regioonis puudub PAS-B domään, mis vastutab ligandi sidumise ning Hsp90 interakteerumise eest AhR valgus. Puudub ka transaktivatsioonidomään valguga C-terminaalses osas, mistõttu AhRR ei ole võimeline geeniekspressiooni aktiveerima (Hahn, 2002). Kuna Pro185Ala polümorfism asub AhRR valguga dimerisatsioonidomäänis (ekson 5), on spekuleeritud, et see polümorfism võib mõjutada valguga represserivat funktsiooni. Arvatakse, et muutus 185. koodonis võib põhjustada repressori nõrgemat tagasiside võimet, mis omakorda võib viia keskkonnakemikaalide võimendunud toksilisusele (Fujita *et al.*, 2002).

Testises on näidatud kõrget AhRR ekspressiooni, seejuures CYP1A1 ekspressioonitase on madal (Yamamoto *et al.*, 2004). Võimalik, et siin on tegu mehhanismiga, mis kaitseb

sugurakke oksüdatiivse stressi eest. Ala185Pro polümorfism võib muuta seda tasakaalu nõrgendades AhR represseerimist, kuna AhRR valk ei ole võimeline enam sama tugevusega ARNT valguga dimeriseeruma ning retseptoriga konkureerima. See omakorda lubab ksenobiootiliste ühendite poolt pideval tasemel aktiveeritud AhR valgul veelgi intensiivsemalt oma sihtmärkgeene aktiveerida ning sekkuda suguhormoonide signaaliradadesse.

On näidatud, et AhR aktiveerib *Bax* geeni, see omakorda aktiveerib sündmuste kaskaadi, mis viib apoptoosini (Matikainen *et al.*, 2001). Samuti on näidatud, et see geen ekspresseerub spermatogeenses koes (Tanaka *et al.*, 2002). Juhul, kui Pro185Ala polümorfism mõjutab AhRR valgu negatiivse tagasiside teostamise võimet võiks arvata, et see omab efekti ka *Bax* geeni ekspresseerumisele. *Bax* geeni suurenenud ekspressioon võib viia spermatogeensete rakkude apoptoosini valedel ajal, mis omakorda väljendub madalas või puudulikus spermakontsentratsioonis. Seega võib AhR konstitutiivne aktiveeritus ksenobiootiliste ühendite poolt ning AhRR valgu nõrgem tagasiside võime testises olla üks häirunud spermatogeneesi põhjustajaid. Ka võib antud võimalus seletada Ala/Ala genotüübi sagedasemat esinemist just azoospermiaga patsientide hulgas.

Samas, kuna patsientidel ilmnes kõrge FSH tase, ning on teada, et FSH on AhR antagonist ning omab testises anti-apoptootilist toimet, võib põhjus olla ka muus.

Kindlasti on FSH ja LH kõrge tase patsientidel viide sellele, et organismis ei ole kõik tasakaalus. Samuti võiks siinkohal arvata, et kõrvalekalle nende hormoonide tasemes on mingi patoloogilise protsessi tagajärjel tekkinud sekundaarne nähtus. Seega ei välista kõrge FSH tase patsientidel ka ulatusliku AhR indutseeritud (spermatogeensete tüvirakkude) apoptoosi toimumise võimalust viljatuse kujunemise algetappidel, kuid viitab kindlasti ka muudele põhjuslikele teguritele.

Kõigele vaatamata on eelpooltoodu siiski spekulatiivne, kuna siiani on kõik *AHRR* Pro185Ala polümorfismi ning mehepoolse fertiilsuspotentsiaali või väliste suguelundite anomaaliade vahelist korrelatsiooni analüüsivad tööd olnud olemuselt kirjeldavad. Seega, enne põhjapanevate järelduste tegemist tuleks selle polümorfismi mõju kindlakstegemiseks läbi viia funktsionaalsuse uuringud.

5.2 Faas I detoksifikatsiooniensüümid

CYP450 ensüümide ülesandeks on hüdrofoobsete AhR ligandide aktiveerimine enne nende konjugeerimist (Nakata *et al.*, 2006). Kui AhR signaalirajas on polümorfisme vähe näidatud, siis detoksifikatsiooniensüümide polümorfismide nimistu on pikk ning seoses sellega on

indiviidide vahel näidatud ka väga suurt varieeruvust vastuvõtlikkuses mitmetele ravimitele ja muudele ksenobiootilistele ühenditele (Nebert *et al.*, 2004).

Käesolevas töös vaadeldi geneetilist varieeruvust CYP1A1, CYP1A2 ning CYP1B1 geenides. Kuigi CYP450 geeniperekond on väga suur, valiti mainitud geenid just seetõttu, et need on reguleeritud AhR signaaliraja poolt ning nende produktid on põhilised AhR ligandide metaboliseerijad.

Assotsiatsioonianalüüsil saadi üks statistiliselt piiripealse olulisusega tulemus *CYP1B1* geenis lokaliseeruva Arg48Gly (C>G) põhjustava muutusega. Regressioonanalüüs näitas selget Arg/Arg genotüübi sageduse tõusu patsientide hulgas, kusjuures azoospermiaga meestel esines see genotüüp kõige sagedamini, rõhutades võimalust, et CYP1B1 Arg48Gly lookus on seotud üldiselt viljatuse kujunemisega.

Milline on vaatlusaluse polümorfismi mõju fenotüübile, ei ole selge. Arg48Gly polümorfism jääb välja CYP1B1 valgu transmembraansest domäänist (Mammen *et al.*, 2003). Samuti on funktsionaalsuse analüüsides näidatud, et Arg48Gly polümorfism ei muuda ensüümi aktiivsust (McLellan *et al.*, 2000).

Arg48Gly variatsiooni ei ole siiski vaadeldud eraldi, vaid enamjaolt mitme erineva mittesünonüümse polümorfismi moodustatud haplotüübi koosseisus (Mammen *et al.*, 2003, Long *et al.*, 2006). Ka on arvatud, et CYP geenide puhul tulekski ensüümiaktiivsuse varieeruvuse põhjust otsida just nimelt erinevate haplotüüpide esinemisest, mitte vaadeldes üksikute muutuste mõju eraldi (Ingelman-Sundberg, 2004).

Kirjanduse andmetel on Arg48Gly ning Ala119Ser lookused omavahel tugevalt aheldunud (McLellan *et al.*, 2000), antud töös seda haploblokki ei olnud võimalik analüüsida, kuna viimane lookus ei vastanud HW tasakaalule ning jäeti seetõttu assotsiatsiooniuuringust välja. Käesolevas töös leiti CYP1B1 geeni haplotüübianalüüsil tähendusrikas seos viljatuse ning Arg48Gly ja Leu432Val lookuste ArgLeu haplotüübi puhul, mida esines patsientidel kontrollidest rohkem. Kirjanduses on andmeid, et see haplotüübivariant ensüümi aktiivsust ei mõjuta (Aklillu *et al.*, 2002).

Antud töös leiti assotsiatsioon *wild type* ehk nn kõrge aktiivsusega alleeli(de)ga. Selle tulemuse reaalselt seost viljatuse kujunemisega võib vaid spekulatsioonida. Kirjanduse andmetel on CYP1B1 (ja üldiselt CYP ensüümide) kõrget aktiivsust peetud mutageensete ja kartsinogeensete ühendite ning oksüdatiivse stressi tekkepõhjuseks. CYP1B1 üleekspressiooni on näidatud mitmete vähivormide, sealhulgas testikulaarse vähi puhul (Aklillu *et al.*, 2005). Tuginedes katsetele *CYP1B1 knock-out* hiirtega, arvatakse, et selle

ensüümi kõrge aktiivsus on paljude PAH ja HAH ühendite poolt põhjustatud patoloogiate puhul võimendajaks (Nebert *et al.*, 2004).

Samas ei saa CYP1 ensüümide funktsiooni pidada üldiselt organisimile kahjulikuks. Üldjuhul omavad CYP1 ensüümid siiski kaitsvat funktsiooni, seda eeldusel, et on tagatud faas I ning faas II tihe koostöö. Seega sõltub CYP1 detoksifikatsioon *versus* toksiliste ühendite aktivatsioon nende valkude hulgast ning lokalisatsioonist rakus. Samuti faas II metabolismi kvaliteedist ja ulatusest ja erinevate faaside omavahelisest efektiivsest koostööst. Oluline tegur on ka rakutüübi ning koespetsiifiline kontekst (Nebert *et al.*, 2004).

CYP1B1 valk on konstitutiivselt ekspresseeruv testises ning arvatakse, et selle ensüümi koostöö faas II ensüümidega pole nii tugev kui CYP1A1 ja CYP1A2 ensüümide puhul (Shimada *et al.*, 1996). Sellest tulenevalt võib oletada, et *wild type* alleel(id) on vastutav(ad) CYP1B1 valgu osalemise eest mitmetes patoloogiates, samas kui mutantne alleel omab protektiivset toimet.

Lisaks on võimalik, et antud polümorfism moodustab käesolevas töös uuritud patsientidel haplotüübi/haplobloki sellis(t)e polümorfismi(de)ga, mis CYP1B1 aktiivsusele suuremat mõju omavad, kuid mida käesolevas töös ei uuritud.

5.3 Faas II detoksifikatsiooniensüümid

Faas II detoksifikatsiooniensüümid viivad läbi CYP450 ensüümide poolt aktiveeritud ühendite konjugatsiooni hüdrofiilsete rühmadega. Tulemuseks on vees lahustuvad ühendid, mida on võimalik rakust ja lõppkokkuvõttes organismist kergesti väljutada. Puudulik faas II ensüümide funktsioneerimine võib viia reaktiivsete ühendite akumulatsioonini ning häirida raku üldist elutegevust läbi oksüdatiivse stressi ning genotoksiliste ühendite tekke (Nakata *et al.*, 2006). Seega on oluline, et toimuks nii aktiveerivate kui konjugeerivate ensüümide koordineeritud funktsioneerimine.

Detoksifikatsioonisüsteem töötab pea kõigis kudedes, seega võib mõni viga selles süsteemis omada kahjulikku toimet just eriti tundlikele organitele nagu reproduktiivsüsteem. Faas II ensüümide geenid ei ole võrreldes faas I geenidega nii polümorfsed ning muutused neis geenides omavad ilmselt tugevamat toimet kogu detoksifikatsioonisüsteemi toimimisele.

Käesolevas töös uuritud faas II ensüümidest leiti tähendusrikas assotsiatsioon viljatusega NAD(P)H:kinoon oksidoreduktaasi ning epoksiid hüdrolaasi geenide polümorfismide puhul. Statistiliselt piiripealne seos käesolevas töös uuritava haigusfenotüübiga saadi glutatioon-S-transferraas A1 polümorfismi puhul.

NAD(P)H:kinoon oksidoreduktaasi NQO1 on flavoensüüm, mis teostab laia valiku substraatide 2 elektroni kaupa redutseerimist (Ross&Siegel, 2004). NQO1 kodeeriva geeni regulatoorses piirkonnas on nii XRE kui ARE elemendid, mistõttu on selle geeni ekspressioon võimalik nii AhR sõltuva kui Nrf2-sõltuva (oksüdatiivse stressi poolt indutseeritud) raja läbi (Radjendiranea&Jaiswal, 1999, Ross&Siegel, 2004). Kõige selle eesmärgiks on rakkude kaitsmine oksüdatiivse stressi ning muude kahjustuste eest. NQO1 aitab hoida ka ubikinooni ning vitamiin E antioksidatiivses vormis, panustades sel viisil veel lisaks rakkude kaitsesse reaktiivsete hapnikuühendite eest (Ross&Siegel, 2004).

NQO1 geeni kodeerivas alas on leitud väga vähe polümorfisme, käesolevas töös uuriti neist kahte: Pro187Ser ning Arg139Trp.

NQO1 geeni koodonis 187 olev mittesünonüümne Pro>Ser (C>T) muutus vastutab selle ensüümi detoksifikatsioonivõime languse eest. On näidatud, et kui üks Ser alleel põhjustab vaid osalist muutust ensüümiaktiivsuses, siis homosügootse mutantse genotüübiga rakud küll ekspresseerivad NQO1 mRNA-d, kuid valku sealt praktiliselt ei detekteeritud (Ross, 2005). Puudulik ensüümiaktiivsus võib viia hulga reaktiivsete ühendite ning oksüdatiivse stressi tekkele rakus. Põhjus, miks antud mittesünonüümse muutuse puhul piisavalt valku ei produtseerita, ei ole veel päris selge, kuid arvatakse, et Ser/Ser polümorfismiga valk on ebastabiilne ning degradeeritakse kiiresti. On pakutud, et Pro>Ser muutus ei võimalda vastsünteesitud valgul interakteeruda tsaperonvalkudega ning seetõttu ei pakita seda õigesti. Valestipakkimine on omakorda signaaliks degradeerimisele (Siegel *et al.*, 2001).

Pro187Ser polümorfism on NQO1 geenis kõige rohkem uuritud polümorfism ning seda eelkõige seoses erinevate vähivormidega. Enim on assotsiatsiooni leitud leukeemiaga (Wiemels *et al.*, 1999, Naoe *et al.*, 2000).

Kuna NQO1 kaitseb rakke oksüdatiivse stressi, keemilise kartsinogeneesi ning mutageneesi eest, võiks arvata, et mitteaktiivset NQO1 vormi omavatel indiviididel on palju suurem risk vähi ning muude patoloogiate kujunemiseks. Siiski on seni teostatud assotsiatsioonitööd andnud üsna vastuolulisi tulemusi (Rosvold *et al.*, 1995, Wiencke *et al.*, 1997, Chen *et al.*, 1999, Lewis *et al.*, 2001, Sunaga *et al.*, 2002).

Käesolevas töös esines patsientidel kontrollidest rohkem *wild type* Pro/Pro genotüüpi, kusjuures ilmnes selle genotüübi tõusev seos mehepoolse viljastuse raskusastmega. Seega esines azoospermiaga meestel võrreldes oligozoospermiaga patsientidest suhteliselt rohkem Pro/Pro genotüüpi.

Sellist tulemust võib seletada NAD(P)H:kinoon oksidoreduktaasi kahetise rolliga. Ühelt poolt on see ensüüm vajalik raku kaitses oksüdatiivse stressi vastu ning teiselt poolt suurendab selle ensüümi tegevus läbi teatud kinoonide redutseerimise (aktiveerimise) nende tsütotoksiliste ühendite kahjulikku toimet (Beall *et al.*, 1998). Nimelt võivad tekkinud hüdrokinoonid autoksüdeeruda ning sellega muuhulgas oksüdatiivset stressi mitmekordselt võimendada (Ross&Siegel, 2004). Seega omab NQO1 mõlemat, nii kahjulikku kui kasulikku toimet sõltuvalt substraadist.

Väljastada ei saa ka seda, et antud töös võib Pro187Ser polümorfismiga saadud korrelatsiooni puhul olla tegu ka väikesest uuritavate hulgast põhjustatud juhusliku kõrvalekaldega.

Käesolevas töös saadi statistiliselt oluline seos viljatusega ka teise NQO1 geeni polümorfismiga. Mittesünonüümne muutus NQO1 geeni koodonis 139 (C>T), mis põhjustab valgus arginiin asendamist trüptofaaniga, on võrreldes Pro187Ser polümorfismiga vähe uuritud. Küll on aga proovitud kindlaks teha selle muutuse mõju valgus funktsionaalsusele.

Arvatakse, et Trp alleeli olemasolu mõjutab NQO1 mRNA splaissimist. NQO1 puhul on näidatud kolme erineva polüadenülatsoonisaidi olemasolu, samuti ka seda, et NQO1 pre-mRNA alternatiivne splaissimine on normaalne, kuigi madalal tasemel toimuv protsess (Pan *et al.*, 1995). Arvatakse, et *wild type* NQO1 alternatiivne splaissimine toimub normaalselt suhtes 90:10 (täispikk variant/alternatiivselt splaisitud mRNA). Arg139Trp polümorfismi puhul on see suhe nihkunud alternatiivselt splaisitud variandi kasuks.

Arg139Trp muutus asub 3 nukleotiidi enne 4. introni 5' pre-mRNA splaissimissaiti ning on esimene splaissingu konsensusjärjestuse positsioonil. Seega on splaissosoomides häiritud U1 snRNA (*small nuclear RNA*) seundumine NQO1 mRNA-ga tänu komplementaarse paardumise katkestamisele. Tulemuseks on alternatiivne splaissing, mille tõttu jäetakse transkriptist välja ka 4. ekson, mis kodeerib ubikinooni siduvat saiti (Pan *et al.*, 2002). Seda lühenenud transkripti valguks ei transleerita (Siegel *et al.*, 2001).

Homosügootses olekus mutantse alleeli (Trp) puhul on NQO1 ensüümi aktiivsus siiski madalal tasemel detekteeritav. Viimane tuleneb ilmselt sellest, et U1 seundumine ei ole alati täpne ning nii võidakse ka mutantse alleeli korral mõnikord splaissimine korrektselt teostada (Pan *et al.*, 2002).

Käesolevas töös leiti, et Trp alleeli olemasolu (nii homo- kui heterosügootses vormis) on tugevaks riskiks viljatusele. Samas viitab antud polümorfismi kõrge esinemissagedus just oligozoospermiaga patsientidel, et muutus omab piisavalt tugevat mõju häirimaks normaalset spermatogeneesi, kuid on tõenäoliselt minoorseks riskiteguriks azoospermia kujunemisel.

Kuna see mutantne alleel põhjustab vähenenud NQO1 ensüümi aktiivsuse, võib Trp alleeli esinemine aidata kaasa viljatuse kujunemisele läbi suurenenud oksüdatiivse stressi, seda enam, et NQO1 on üks põhilisi oksüdatiivse stressi eest kaitsjaid rakus ning NQO1 ekspresseerumist on näidatud muuhulgas ka testises (Chao *et al.*, 2006).

Täpsemalt on NQO1 ekspresseerumist näidatud Leydigi rakkudes ning epididüümises (Zappa *et al.*, 2001). Kuna Leydigi rakud on testosterooni tootjad ning testosteroon on vajalik spermatogeneesi toimumiseks, võib nende rakkude kahjustumise tagajärjeks olla infertiilsus. Käesolevas töös oli patsientidel võrreldes tervete indiviididega madal testosterooni tase ning kõrge LH ning FSH tase. Kõrge LH tase viitab tõenäoliselt nõrgenenud negatiivsele tagasisidele testosterooni poolt ning/või testosterooni puudulikule produktsioonile Leydigi rakkude poolt. Kõrgenenud FSH tase on kahjustunud spermatogeense epiteeli indikaatoriks. Tuginedes antud uuringus saadud tugevale assotsiatsioonile Arg139Trp polümorfismi ja viljatuse vahel, võib oletada, et viljatuse kujunemisel võib oma osa olla NQO1 ebaadekvaatsest funktsioneerimisest tingitud kahjustustel Leydigi rakkudes, mis kas siis otseselt või kaudselt mõjutavad testosterooni produktsiooni. See omakorda viib spermatogeneesi häirimiseni.

Kuigi spermatogeensetes rakkudes NQO1 ekspressiooni näidatud ei ole, ei saa välistada selle ensüümi funktsioneerimist nii Sertoli rakkudes kui arenevates/küpsevates sugurakkudes, mistõttu võib vähenenud NQO1 aktiivsuse mõju reproduktiivsusele olla veelgi ulatuslikum. Arvatakse, et Leydigi rakkude ning spermatogeense epiteeli normaalne funktsioneerimine on omavahel seotud ning ühe üksuse kahjustumine mõjutab kohe ka teist (Howell *et al.*, 1999).

Epoksiid hüdrolaas 1 (EPHX1) on mikrosomaalne detoksifikatsiooniprotsessides osalev ensüüm. EPHX1 omab olulist rolli paljude, sealhulgas ka PAH, ühendite detoksifikatsioonil aga samuti ka aktivatsioonil. Üldjuhul on EPHX1 aktiivsus siiski osaline raku kaitses toksiliste ühendite vastu.

EPHX1 geen on põhiliselt uuritud kahte mittesünonüümset polümorfismi eksonis 3 ning 4 (Hassett *et al.*, 1994). Käesolevas töös leiti assotsiatsioon viljatuse ja 3. eksoni polümorfismi vahel, kus koodonis 113 olev muutus T>C vastutab türosiini asenduse eest histidiini vastu. Kombineeritud genotüübi analüüs näitas Tyr/Tyr genotüübi sagedasemat esinemist patsientide hulgas, mistõttu järeldati, et see genotüüp võib olla infertiilsuse kujunemise riskigenotüübiks. Selle tulemuse muudab vastuoluliseks fakt, et His/His genotüübi puhul on ensüümi aktiivsus tulenevalt valgu ebastabiilsusest 40-50% madalam *wild type* ensüümi aktiivsusest (Hassett *et al.*, 1994).

EPHX1 polümorfismi Tyr113His assotsiatsiooniuuringud mitmete patoloogiatega on näidanud vastuolulisi tulemusi. Korrelatsioon on leitud nii *wild type* alleeli kui mutantse alleeliga. Vastuolulisi andmeid on leitud eelkõige kopsuvähi puhul, kuid suuremad meta-analüüsid viitavad Tyr/Tyr genotüübile kui riskigenotüübile (Lee *et al.*, 2002, Kiyohara *et al.*, 2006). See on ka igati arusaadav, kuna suitsetajate puhul on kokkupuude PAH ühenditega pidev. Ka on kopsus nende ühendite kontsentratsioon kõige suurem. Lisaks on sigarisuitsus olev benso(a)püreen EPXH1 puhul substraadiks, mida konverteeriakse veelgi aktiivsemasse vormi. Käesolevas töös puuduvad patsientide puhul täpsed andmed eluviisi kohta. Seega ei saa kindlalt öelda, milline on benso(a)püreeni roll antud juhul.

EPHX1 kõrge aktiivsusega genotüübi (Tyr/Tyr) puhul on leitud seos ka munasarjavähi puhul. Arvatakse, et see võib peegeldada nii eksogeense kui endogeense substraadi suurenenud konversiooni reaktiivsemateks ja mutageensemateriks diool-epoksiid derivaatideks (Lancaster *et al.*, 1996). Sama mehhanismi võiks ka antud juhul pidada tulemusi seletavaks, kuid siinkohal tuleb siiski silmas pidada käesolevas töös uuritava patoloogia iseloomu erinevust vähkkasvajatest. Seega võiks arvata, et Tyr113His polümorfismist tulenev toimemehhanism viljatuse kujunemisse on veidi teistsugune, näiteks seotud mõne muu funktsionaalse muutusega.

Glutatioon-S-transferaas A1 (GSTA1) kuulub suurde GST valkude perekonda, mis osalevad laia valiku endogeensete ning eksogeensete ühendite faas II metabolismis (Strange *et al.*, 2001). Polümorfismid neid kodeerivates geenides on aluseks varieeruvusele indiviididevahelises vastuvõtlikkuses mitmesugustele keemilistele ühenditele. Põhiliselt on sellest perekonnast vaatluse all olnud väga polümorfseid M, T ja P klassi glutatioontransferaasid (Naoe *et al.*, 2000, Ertunc *et al.*, 2005, Chung *et al.*, 2006). Kuigi ka GSTA1 on näidatud olevat väga polümorfne, on assotsiatsiooniuuringuid selle geeni polümorfismidega läbi viidud vaid väheste puhul. Peamiselt on uuritud GSTA1 promooteralas olevat neljast SNP-st koosnevat haplotüüpi. Erinevate haplotüüpidega on leitud seost rinnavähi ning eesnäärmevähi tekkega (Komiya *et al.*, 2005, Ahn *et al.*, 2006).

Käesolevas töös saadi statistiliselt piiripealne assotsiatsioon infertiilsuse ning mittesünonüümse muutusega koodonis 112, kus C asendumine G-ga põhjustab valgus aminohappelist muutust (Cys>Ser). Genotüübianalüüsil ilmnes tendents Ser/Ser genotüübi esinemisele sagedamini patsientide seas. Seega viitavad tulemused sellele, et Ser/Ser võib olla riskigenotüüp viljatusele.

Cys112Ser polümorfismi pole varasemates töödes kirjeldatud. Siiski on teada, et valgu positsioonis 112 asuv aminohape paikneb hüdrofoobse substraadi sidumise domääni kõrval. Kuigi selles positsioonis olev aminohape ei ole aktiivsaidis otseselt osalev, asub tema kõrval (koodon 111) hüdrofoobse substraadisidumissaidi viimane aminohappejääk. Sellest tulenevalt on spekulieritud, et aminohappe muutus positsioonis 112 mõjutab mingil määral ka ensüümi substraadisidumist ning katalüütilist võimet (Lyon&Atkins, 2002).

GST valkude (sealhulgas GSTA1) ekspressioon on testises väga kõrgel tasemel. Tõenäoliselt on see seletatav sugurakkude suurema kaitsevajadusega ja tundlikkusega oksüdatiivsele stressile ning paljudele reaktiivsetele ühenditele (Rowe *et al.*, 1997). Reaktiivsete hapnikuühendite nn “kustutamine” on oluline ka spermatogeenseid rakke toetavates rakkudes (Leydigi, Sertoli rakud) (Castellón, 1999).

Olenemata piiripealsest assotsiatsioonist on võimalik, et GSTA1 polümorfism mõjutab viljatuse kujunemist. Seejuures ei pruugi siiski GSTA1 võimalik defekt ainuüksi oksüdatiivse stressi drastilise suurenemise põhjuseks olla, kuna testises ekspresseerub veel suur hulk muid glutatioon-S-transferaase ning teisi ensüüme, mis kõik suuremal või vähemal määral reaktiivsete ühenditega toime tulevad. Küll võib aga kaitse reaktiivsete ühendite vastu olla halvenenud näiteks mitme kaitsva ensüümi funktsioneerimise muutusel.

Peale kahe erandi ei ole käesolevas töös uuritud polümorfisme varem infertiilsusega seoses vaadeldud. Fritsche ja kolleegid (1998) leidsid assotsiatsiooni *CYP1A1* Ile462Val polümorfismiga ning Watanabe ja kolleegid (2004) näitasid korrelatsiooni viljatuse ning *AhRR* Pro185Ala polümorfismi vahel (Fritsche *et al.*, 1998, Watanabe *et al.*, 2004). Käesolevas töös *CYP1A1* polümorfismiga varem kirjeldatud seost näidata ei õnnestunud.

Lisaks polümorfismidele erinevates detoksifikatsiooniprotsessidega seotud geenides mängib viljatuse puhul kindlasti rolli ka geneetilise variatsiooni kombineerumine erinevate geenide korral. Seeetõttu on tulemuste interpreteerimine ning põhjuslike tegurite väljaselekteerimine infertiilsuse kontekstis komplitseeritud.

Antud töö puhul raskendab tulemuste tõlgendamist ka suhteliselt heterogeenne patsientide grupp, kuna idiopaatiline viljatus kujutab endast hetkel veel identifitseerimata põhjusega viljatust. Uuringu ettevalmistamisel jäeti uuritavate grupist välja kõik indiviidid, kelle kliinilised andmed viljatuse kujunemiseks mõnda teadolevat põhjust pakkusid.

Käesolevas töös saadud tulemused näitavad, et detoksifikatsioonisüsteemi polümorfismidel võib olla oma roll mehepoolse viljatuse kujunemises. Veelgi enam, kuigi antud töös uuritud patsientide grupp oli suhteliselt heterogeenne, pakub antud töö siiski võimalusi seletamaks idiopaatilise viljatuse võimalikke põhjuseid.

Parema ülevaate saamiseks ning põhjanevamate järelduste tegemiseks on siiski vajalik suurendada nii uuritavate patsientide kui kontrollindiviidide arvu. Lisaks suurema valiku kodeerivate SNP-de uuringusse haaramisele oleks huvitav analüüsida ka regulatoorse piirkonna polümorfisme ning teostada haplotüübi analüüs.

Kokkuvõtteks võib öelda, et antud uuring on pilootuuringuks detoksifikatsiooniensüümide osalusest mehepoolse viljatuse kujunemisel. Käesoleva töö tulemused näitavad, et antud valdkonna edasine uurimine on vajalik ning kindlasti ka huvipakkuv.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö kirjanduse osas on antud ülevaade arüülsüsivesinike (AhR) signaalirajast kui ksenobiootiliste ühendite põhilisest toksilise mõju vahendajast ning selle raja võimalikest toimemehhanismidest infertiilsuse kujunemisel. Käsitletakse ka AhR poolt ühe peamise sihtmärgina aktiveeritavat detoksifikatsioonisüsteemi, mille puhul kirjeldatakse põhjalikumalt eraldi faas I, faas II ja faas III süsteeme.

Töö praktilises osas genotüpiseeriti alleelspetsiifilise PCR ning APEX meetoditega kokku 383 indiviidi, kellest 171 olid infertiilsed patsiendid (45 azoospermiaga ja 126 oligozoospermiaga meest) ning 212 kontrollindiviidid. 15 geenist uuriti kokku 28 polümorfismi. Genotüpiseerimise järgselt teostati uuringurühmadele marker – fenotüüp assotsiatsiooniuuring ning LD ja haplotüübianalüüs.

Täendusrikas assotsiatsioon viljatuse kujunemisega leiti nelja lookuse puhul - *AhRR* Pro185Ala, *NQO1* Pro187Ser, *NQO1* Arg139Trp ning *EPHX1* Tyr113His. Statistiliselt piiripealse olulisusega tulemus saadi *CYP1B1* Arg48Gly ning *GSTA1* Cys112Ser lookuste puhul. LD analüüs näitas *CYP1B1* geenis nõrgalt aheldunud lookuspaare, kuid erinevate lookuste haplotüübianalüüsil leiti üks haplotüüp (Arg48 ja Leu432), mille esinemise sagedus patsientide ning kontrollide vahel erines oluliselt.

Käesolevas töös saadud tulemused annavad alust oletada, et polümorfismid AhR signaaliraja ning selle poolt aktiveeritava detoksifikatsioonikaskaadi geenides omavad võimalikku seost mehe viljatuse kujunemisega, mõjutades tõenäoliselt organismi vastuvõtlikkust ksenobiootilistele ühenditele.

Antud magistritöö tulemused on esialgsed, kuid näitavad, et edasised ning põhjalikumad uuringud on põhjendatud. Idiopaatilise põhjusega mehepoolne infertiilsus iseloomustab väga heterogeenset patsiendigruppi. Samas, assotsiatsiooniuuringud annavad võimaluse leida võimalikke seletusi selle fenotüübi paremaks kirjeldamiseks ning võiksid tulevikus aidata paremini hinnata viljatuse põhjuseid ning seoses sellega tagada ka parema ravi.

Summary

Infertility is a rising problem concerning approximately one in six couples. 40% of that is attributed to male factor. Although large amount of reasons for infertility are identified, a considerable part is still unknown. Also, over past decades there has been a concern over decreasing male reproductive health. Circumstantial evidence is showing that environmental xenobiotics may disrupt reproductive processes in males. Approximately one third of unexplained male infertility has been attributed to adverse environmental factors including exposure to hazardous environmental contaminants as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs). Most of the biological effects of PAHs and HAHs are initiated by their binding to a cytosolic protein, aryl hydrocarbon receptor (AhR), an essential step that leads to consequent activation of AhR mediated signal transduction pathway. The function of AhR is capable of influencing large scale of events in organism including interrupting the hormonal pathways and initiating apoptosis in germ cells. One of the main targets of AhR is the activation of detoxification system (Phase I, II, III), which metabolizes hydrophilic AhR ligands to more watersoluble compounds in order to be able to excrete them from organism. It is believed that the genetic variance in genes of those proteins is responsible for the wide difference in response to xenobiotic compounds adverse effects to the organism.

In the present study we have conducted a case-control association study with 28 genetic variants in the genes of detoxificationsystem proteins to determine their role in development of severe male infertility, using allele-specific PCR and APEX technology for genotyping. 171 patients diagnosed with either azoospermia or severe oligozoospermia (45 and 126 respectively), and 212 healthy individuals were recruited from Estonian population.

Alltogether we found that 6 polymorphisms: *AhRR* Pro185Ala, *NQO1* Pro187Ser, *NQO1* Arg139Trp, *EPHX1* Tyr113His, *CYP1B1* Arg48Gly and *GSTA1* Cys112Ser may play role in genetic predisposition to male factor infertility. We also found one combination of loci in *CYP1B1* gene to form a haplotype that was significantly more frequent in patients than those in healthy controls.

Our results give support to the possible role of genomic variations in detoxificationcascade in genetic predisposition to male factor infertility. Also it gives insight to possible explanations to a condition currently known as idopathic infertility.

Tänuavaldused

Suure abi eest käesoleva töö valmimisel soovin eriti tänada oma juhendajaid Signe Altmäed, Maire Petersit ja Andres Salumetsa. Suur tänu ka Kadri Hallerile statistiliste analüüside läbiviimise eest. Tänan ka kõiki ülejäänud õppetooli inimesi, peret ja sõpru abi ja toetuse eest. Samuti tänan koostöö eest dr. Margus Punabit, Tarmo Tiidot ning firma Asper Biotech Ltd kollektiivi.

Kasutatud kirjandus

- Adachi, J., Y. Mori, S. Matsui, H. Takigami, J. Fujino, H. Kitagawa, C. Miller, T. Kato, K. Saeki, and T. Matsuda. 2001.** Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276: 31475-314758.
- Ahn, J., M. Gammon, R. Santella, M. Gaudet, J. Britton, S. Teitelbaum, M. Terry, A. Neugut, S. Eng, Y. Zhang, C. Garza, and C. Ambrosone. 2006.** Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk. *Carcinogenesis* 27: 1876-82.
- Aklillu, E., S. Ovrebo, I. Botnen, C. Otter, and M. Ingelman-Sundberg. 2005.** Characterization of common CYP1B1 variants with different capacity for benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol epoxide formation from benzo[a]pyrene. *Cancer Res* 65: 5105-11.
- Aljanabi, and Martinez. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-3.
- Alkan, I., F. Simsek, G. Haklar, E. Kervancioglu, H. Ozveri, S. Yalcin, and A. Akdas. 1997.** Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 157: 140-3.
- Amaral Mendes, J. 2002.** The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chem Toxicol* 40: 781-8.
- Auger, J., J. Kunstmann, F. Czyglik, and P. Jouannet. 1995.** Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 332: 281-5.
- Aydemir, B., I. Onaran, A. Kiziler, B. Alici, and M. Akyolcu. 2007.** Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl.* 9: 108-15.
- Barrett, J., B. Fry, J. Maller, and M. Daly. 2005.** Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5.
- Beall, H. D., A. Hudnott, S. Winski, D. Siegel, E. Swann, D. Ross, and C. Moody. 1998.** Indolequinone antitumor agents: relationship between quinone structure and rate of metabolism by recombinant human NQO1. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 8: 545-8.
- Becker, S., and K. Berhane. 1997.** A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. *Fertil Steril* 67: 1103-8.
- Brooks, R., N. Gooderham, R. Edwards, A. Boobis, and D. Winton. 1999.** The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine. *Carcinogenesis* 20: 109 -14.
- Burt, R., and S. Thorgeirsson. 1988.** Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst* 80: 1383-6.
- Bustos-Obregon, E., M. Courot, J. Flechon, M. Hochereau-de-Reviers, and A. Holstein. 1975.** Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia* 7: 141-63.
- Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding, and N. Skakkebaek. 1992.** Evidence for decreasing quality of semen during past 50 year. *BMJ* 305: 609-13.
- Carver, L., and C. Bradfield. 1997.** Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272: 11452-6.
- Castellon, E. 1999.** Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. *Int J Androl* 22: 49-55.
- Castellón, E. 1999.** Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. *Int J Androl* 22: 49-55.
- Cauchi, S., I. Stucker, S. Cenee, P. Kremers, P. Beaune, and L. Massaad-Massade. 2003.** Structure and polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR)

- gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Pharmacogenetics* 13.
- Cauchi, S., I. Stucker, C. Solas, P. Laurent-Puig, S. Cenee, D. Hemon, M. Jacquet, P. Kremers, P. Beaune, and L. Massaad-Massade. 2001.** Polymorphisms of human aryl hydrocarbon receptor (AhR) gene in a French population: relationship with CYP1A1 inducibility and lung cancer. *Carcinogenesis* 22: 1819-24.
- Chahoud, I., J. Hartmann, G. Rune, and D. Neubert. 1992.** Reproductive toxicity and toxicokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects of single doses on the testis of male rats. *Arch Toxicol* 66: 567-72.
- Chao, C., Z. Zhang, J. Berthiller, P. Boffetta, and M. Hashibe. 2006.** NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser polymorphism and the risk of lung, bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 979-87.
- Chen, H., A. Lum, A. Seifried, L. Wilkens, and L. Le Marchand. 1999.** Association of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 609C-->T polymorphism with a decreased lung cancer risk. *Cancer Res* 59: 3045-8.
- Chen, S., L. Chang, H. Chen, and Y. Wei. 2002.** Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 17: 718-25.
- Chung, Y., H. Cha, I. Kang, Y. Hwang, and S. Kim. 2006.** Polymorphism at the glutathione S-transferase P1 locus in Korean patients with perennial allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 20: 648-51.
- Colborn, T., F. vom Saal, and A. Soto. 1993.** Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-84.
- Conney, A. 1982.** Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42: 4875-917.
- De Celis, R., A. Feria-Velasco, M. Gonzalez-Unzaga, J. Torres-Calleja, and N. Pedron-Nuevo. 2000.** Semen quality of workers occupationally exposed to hydrocarbons. *Fertil Steril* 73: 221-8.
- De Jager, C., P. Farias, A. Barraza-Villarreal, M. Avila, P. Ayotte, E. Dewailly, C. Dombrowski, F. Rousseau, V. Sanchez, and J. Bailey. 2006.** Reduced Seminal Parameters Associated With Environmental DDT Exposure and *p,p*'-DDE Concentrations in Men in Chiapas, Mexico: A Cross-Sectional Study. *Journal of Andrology* 27: 16-27.
- Dean, M., Y. Hamon, and G. Chimini. 2001.** The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-17.
- del Moral, R., A. Olmo, M. Aguilar, and F. O'Valle. 1998.** P glycoprotein: a new mechanism to control drug-induced nephrotoxicity. *Exp Nephrol* 6: 89-97.
- DePierre, J., and R. Morgenstern. 1983.** Comparison of the distribution of microsomal and cytosolic glutathione-S-transferase activity in different organs of the rat. *Biochem. Pharmacol* 32: 721-3.
- Dialyna, I., D. Arvanitis, and D. Spandidos. 2001.** Genetic polymorphisms and transcriptional pattern analysis of CYP1A1, AhR, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 genes in breast cancer. *Int J Mol Med* 8: 79-87.
- DiBiasio, K., M. Silva, L. Shull, J. Overstreet, B. Hammock, and M. Miller. 1991.** Xenobiotic metabolizing enzyme activities in rat, mouse, monkey, and human testes. *Drug Metab Dispos* 19: 227-32.
- Dunn, R. n., and C. Klaassen. 1998.** Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab Dispos* 26: 598-604.
- Ebert, B., A. Seidel, and A. Lampen. 2005.** Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis* 26: 1754-63.

- el-Sabeawy, F., S. Wang, J. Overstreet, M. Miller, B. Lasley, and E. Enan. 1998.** Treatment of rats during pubertal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm. *Toxicol Appl Pharmacol* 150: 427-42.
- Ertunc, D., M. Aban, E. Tok, L. Tamer, M. Arslan, and S. Dilek. 2005.** Glutathione-S-transferase P1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis. *Hum Reprod* 20: 2157-61.
- Falany, C. 1997.** Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 11: 206-16.
- Fardel, O., V. Lecureur, A. Corlu, and A. Guillouzo. 1996.** P-glycoprotein induction in rat liver epithelial cells in response to acute 3-methylcholanthrene treatment. *Biochem Pharmacol* 51: 1427-36.
- Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, D. Hilbert, T. McPhail, S. Lee, S. Kimura, D. Nebert, S. Rudikoff, J. Ward, and F. Gonzalez. 1995.** Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722-6.
- Fretland, A., and C. Omiecinski. 2000.** Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem Biol Interact* 129: 41-59.
- Fritsche, E., H. Schuppe, O. Dohr, T. Ruzicka, E. Gleichmann, and J. Abel. 1998.** Increased frequencies of cytochrome P4501A1 polymorphisms in infertile men. *Andrologia* 30: 125-8.
- Fujii-Kuriyama, Y., and J. Mimura. 2005.** Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 311-7.
- Fujisawa-Sehara, A., K. Sogawa, M. Yamane, and Y. Fujii-Kuriyama. 1987.** Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Research* 15: 4179-91.
- Fujita, H., R. Kosaki, H. Yoshihashi, T. Ogata, M. Tomita, T. Hasegawa, T. Takahashi, N. Matsuo, and K. Kosak. 2002.** Characterization of the aryl hydrocarbon receptor repressor gene and association of its Pro185Ala polymorphism with micropenis. *Teratology* 65: 10-8.
- Gamage, N., A. Barnett, N. Hempel, R. Duggleby, K. Windmill, J. Martin, and M. McManus. 2006.** Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 90: 5-22.
- Gray, L., J. Ostby, and W. Kelce. 1997.** A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 146: 11-20.
- Gu, Y., J. Hogenesch, and C. Bradfield. 2000.** The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 519-61.
- Guengerich, F. 2003.** Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 3: 194-204.
- Guo, S. 2006.** The association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving dioxin detoxification enzymes: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 124: 134-43.
- Hahn, M. 2002.** Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141: 131-60.
- Hankinson, O. 1995.** The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 307-40.
- Harper, P., J. Wong, M. Lam, and A. Okey. 2002.** Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact* 141: 161-87.

- Hassett, C., L. Aicher, J. Sidhu, and C. Omiecinski. 1994.** Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 3: 421-8.
- Hayes, J., and D. Pulford. 1995.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30: 445-600.
- Higgins, C., and M. Gottesman. 1992.** Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 17: 18-21.
- Honkakoski, P., and M. Negishi. 2000.** Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347: 321-37.
- Howell, S., J. Radford, W. Ryder, and S. Shalet. 1999.** Testicular function after cytotoxic chemotherapy: evidence of Leydig cell insufficiency. *J Clin Oncol* 17: 1493-8.
- Ingelman-Sundberg, M. 2004.** Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedeberts Arch Pharmacol* 369: 89-104.
- Jana, N., S. Sarkar, M. Ishizuka, J. Yonemoto, C. Tohyama, and H. Sone. 1999.** Cross-talk between 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and testosterone signal transduction pathways in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 462-8.
- Karchner, S., D. Franks, W. Powell, and M. Hahn. 2002.** Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J Biol Chem* 277: 6949-59.
- Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz. 1999.** Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274: 13519-24.
- Kawajiri, K., J. Watanabe, H. Eguchi, and S. Hayashi. 1995.** Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 5: S70-3.
- Khorram, O., M. Garthwaite, J. Jones, and G. Thaddeus. 2004.** Expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) mRNA expression in human spermatozoa. *Med Sci Monit* 10: 135-8.
- Kiyohara, C., K. Yoshimasu, K. Takayama, and Y. Nakanishi. 2006.** EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer: a HuGE review. *Epidemiology* 17: 89-99.
- Klinge, C., J. Bowers, P. Kulakosky, K. Kamboj, and H. Swanson. 1999.** The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Molecular and Cellular Endocrinology* 157: 105-19.
- Komiya, Y., H. Tsukino, H. Nakao, Y. Kuroda, H. Imai, and T. Katoh. 2005.** Human glutathione S-transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 238-42.
- Korashy, H., and A. El-Kadi. 2006.** Transcriptional regulation of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase ya genes by mercury, lead, and copper. *Drug Metab Dispos* 34: 152-65.
- Kozak, K., B. Abbott, and O. Hankinson. 1997.** ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191: 297-305.
- Kristiansen, O., Z. Larsen, J. Johannesen, J. Nerup, T. Mandrup-Poulsen, and F. Pociot. 1999.** No linkage of P187S polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1/DIA4) and type 1 diabetes in the Danish population. DIEGG and DSGD. Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group and The Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Hum Mutat.* 14: 67-70.
- Kurg, A., N. Tonisson, I. Georgiou, J. Shumaker, J. Tollett, and A. Metspalu. 2000.** Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test* 4: 1-7.

- Köhle, C., and K. Bock. 2007.** Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* [Epub ahead of print].
- Lancaster, J., H. Brownlee, D. Bell, P. Futreal, J. Marks, and A. Berchuck. 1996.** Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 17: 160-2.
- Landi, S., F. Gemignani, L. Gioia-Patricola, A. Chabrier, and F. Canzian. 2003.** Evaluation of a microarray for genotyping polymorphisms related to xenobiotic metabolism and DNA repair. *Biotechniques* 35: 816-20, 22, 24-7.
- Larriba, S., L. Bassas, S. Egozcue, J. Gimenez, M. Ramos, O. Briceno, X. Estivill, and T. Casals. 2001.** Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily transporter gene expression in severe male infertility. *Biol Reprod* 65: 394-400.
- Lee, I., and J. Nagayama. 1980.** Metabolism of benzo(a)pyrene by the isolated perfused rat testis. *Cancer Res* 40: 3297-303.
- Lee, W., P. Brennan, P. Boffetta, S. London, S. Benhamou, A. Rannug, J. To-Figueras, M. Ingelman-Sundberg, P. Shields, L. Gaspari, and E. Taioli. 2002.** Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. *Biomarkers* 7: 230-41.
- Leslie, E., R. Deeley, and S. Cole. 2005.** Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 216-37.
- Lewis, S., N. Cherry, R. Niven, P. Barber, and A. Povey. 2001.** Polymorphisms in the NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene and small cell lung cancer risk in a UK population. *Lung Cancer* 34: 177-83.
- Lin, J., and A. Lu. 2001.** Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 535-67.
- Lin, P., J. Chang, J. Ko, S. Liao, and W. Lo. 2004.** Reduction of androgen receptor expression by benzo[alpha]pyrene and 7,8-dihydro-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[alpha]pyrene in human lung cells. *Biochem Pharmacol* 67: 1523-30.
- Lin, T., K. Ko, R. Moore, D. Buchanan, P. Cooke, and R. Peterson. 2001.** Role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of control and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed male mice. *J Toxicol Environ Health A* 64: 327-42.
- Long, J., X. Shu, Q. Cai, H. Cai, Y. Gao, F. Jin, and W. Zheng. 2006.** Polymorphisms of the CYP1B1 gene may be associated with the onset of natural menopause in Chinese women. *Maturitas* 55: 238-46.
- Lyon, R., and W. Atkins. 2002.** Kinetic characterization of native and cysteine 112-modified glutathione S-transferase A1-1: reassessment of nonsubstrate ligand binding. *Biochemistry* 41: 10920-7.
- Ma, G., K. Kinneer, Y. Bi, J. Chan, and Y. Kan. 2004.** Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires CNC (cap $\square$ n $\square$ collar) basic leucine zipper factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem J* 377: 204-13.
- Ma, Q., and J. J. Whitlock. 1996.** The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Molecular and Cellular Biology* 16: 2144-50.
- Mammen, J., G. Pittman, Y. Li, F. Abou-Zahr, B. Bejjani, D. Bell, P. Strickland, and T. Sutter. 2003.** Single amino acid mutations, but not common polymorphisms, decrease the activity of CYP1B1 against (-)benzo[a]pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol. *Carcinogenesis* 24: 1247-55.
- Mandal, P. 2005.** Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol* 175: 221-30.

- Mantovani, A. 2006.** Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1076: 239-52.
- Mathieu, M., I. Lapierre, K. Brault, and M. Raymond. 2001.** Aromatic hydrocarbon receptor (AhR). AhR nuclear translocator- and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance *mdr1* gene by 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene in hepatoma cells. *J Biol Chem* 276: 4819-27.
- Matikainen, T., G. Perez, A. Jurisicova, J. Pru, J. Schlezinger, H. Ryu, J. Laine, T. Sakai, S. Korsmeyer, R. Casper, D. Sherr, and J. Tilly. 2001.** Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 28: 355-60.
- McLellan, R., M. Oscarson, M. Hidestrand, B. Leidvik, E. Jonsson, C. Otter, and M. Ingelman-Sundberg. 2000.** Characterization and functional analysis of two common human cytochrome P450 1B1 variants. *Arch Biochem Biophys* 378: 175-81.
- Melaine, N., M. Lienard, I. Dorval, C. Le Goascogne, H. Lejeune, and B. Jegou. 2002.** Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human. *Biol Reprod* 67: 1699-707.
- Miao, W., L. Hu, P. Scrivens, and G. Batist. 2005.** Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J Biol Chem* 280: 20340-8.
- Mimura, J., and Y. Fujii-Kuriyama. 2003.** Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619: 263-8.
- Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999.** Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13: 20-5.
- Moline, J., A. Golden, N. Bar-Chama, E. Smith, M. Rauch, R. Chapin, S. Perreault, S. Schrader, W. Suk, and P. Landrigan. 2000.** Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environ Health Perspect* 108: 803-13.
- Moon, Y., X. Wang, and M. Morris. 2006.** Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20: 187-210.
- Moore, R., C. Potter, H. Theobald, J. Robinson, and R. Peterson. 1985.** Androgenic deficiency in male rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 79: 99-111.
- Morel, Y., N. Mermoud, and R. Barouki. 1999.** An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Mol Cell Biol* 19: 6825-32.
- Morisseau, C., and B. Hammock. 2005.** Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 311-33.
- Mukhtar, H., I. Lee, G. Foureman, and J. Bend. 1978.** Epoxide metabolizing enzyme activities in rat testes: postnatal development and relative activity in interstitial and spermatogenic cell compartments. *Chem Biol Interact* 22: 153-65.
- Nakata, K., Y. Tanaka, T. Nakano, T. Adachi, H. Tanaka, T. Kaminuma, and T. Ishikawa. 2006.** Nuclear receptor-mediated transcriptional regulation in Phase I, II, and III xenobiotic metabolizing systems. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 437-57.
- Naoe, T., K. Takeyama, T. Yokozawa, H. Kiyoi, M. Seto, N. Uike, T. Ino, A. Utsunomiya, A. Maruta, I. Jin-nai, N. Kamada, Y. Kubota, H. Nakamura, C. Shimazaki, S. Horiike, Y. Kodera, H. Saito, R. Ueda, J. Wiemels, and R. Ohno. 2000.** Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/ myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 6: 4091-5.
- Nebert, D., and D. Russell. 2002.** Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360: 1155-62.

- Nebert, D., T. Dalton, A. Okey, and F. Gonzalez. 2004.** Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 279: 23847-50.
- Nebert, D., A. Roe, M. Dieter, W. Solis, Y. Yang, and T. Dalton. 2000.** Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59: 65-85.
- Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Kato. 2007.** Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 562-6.
- Pajarinen, J., V. Savolainen, M. Perola, A. Penttila, and P. Karhunen. 1996.** Glutathione S-transferase-M1 'null' genotype and alcohol-induced disorders of human spermatogenesis. *Int J Androl* 19: 155-63.
- Pan, S., G. Forrest, S. Akman, and L. Hu. 1995.** NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* 55: 330-5.
- Pan, S., Y. Han, P. Farabaugh, and H. Xia. 2002.** Implication of alternative splicing for expression of a variant NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 with a single nucleotide polymorphism at 465C>T. *Pharmacogenetics* 12: 479-88.
- Pastan, I., and M. Gottesman. 1991.** Multidrug resistance. *Annu Rev Med* 42.
- Perdew, G. 1988.** Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263: 13802-5.
- Peterson, R., H. Theobald, and G. Kimmel. 1993.** Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 23: 283-335.
- Phillips, D. 1999.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443: 139-47.
- Pohjanvirta, R., and J. Tuomisto. 1994.** Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev* 46: 483-549.
- Pollenz, R. 2002.** The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem Biol Interact* 141: 41-61.
- Puga, A., Y. Xia, and C. Elferink. 2002.** Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chemico-Biological Interactions* 141: 117-30.
- Puntarulo, S., and A. I. Cederbaum. 1998.** Production of Reactive Oxygen Species by Microsomes Enriched in Specific Human Cytochrome P450 Enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 1324-30.
- Radjendirane, V., and A. K. Jaiswal. 1999.** Antioxidant response element-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induction of human NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 gene expression. *Biochem Pharmacol* 58: 1649-55.
- Reiners, J. J., and R. Clift. 1999.** Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells. A function independent of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2502-10.
- Reszka, E., W. Wasowicz, and J. Gromadzinska. 2006.** Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* 96: 609-19.
- Revel, A., H. Raanani, E. Younglai, J. Xu, R. Han, J. Svouret, and R. Casper. 2001.** Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol* 15: 479-86.
- Richardson, V., M. Santostefano, and L. Birnbaum. 1998.** Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 225-31.
- Robles, R., Y. Morita, K. Mann, G. Perez, S. Yang, T. Matikainen, D. Sherr, and J. Tilly. 2000.** The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription

- factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology* 141: 450-3.
- Rockett, J., P. Patrizio, J. Schmid, N. Hecht, and D. Dix. 2004.** Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res* 549: 225-40.
- Rodriguez, I., C. Ody, K. Araki, I. Garcia, and P. Vassalli. 1997.** An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-70.
- Ross, D. 2005.** Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: potential clues to benzene toxicity. *Chem Biol Interact* 153-154: 137-46.
- Ross, D., and D. Siegel. 2004.** NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* 382: 115-44.
- Ross, G. 2004.** The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 59: 275-91.
- Rosvold, E., K. McGlynn, E. Lustbader, and K. Buetow. 1995.** Identification of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics* 5: 199-206.
- Rowe, J., E. Nieves, and I. Listowsky. 1997.** Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J* 325: 481-6.
- Rowlands, J., and J. Gustafsson. 1997.** Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27: 109-34.
- Rubin, G., A. Harrold, J. Mills, C. Falany, and M. Coughtrie. 1999.** Regulation of sulphotransferase expression in the endometrium during the menstrual cycle, by oral contraceptives and during early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 5: 995-1002.
- Rushmore, T., and A. Kong. 2002.** Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 3: 481-90.
- Safe, S. 1994.** Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?
- Sarkadi, B., L. Homolya, G. Szakacs, and A. Varadi. 2006.** Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* 86: 1179-236.
- Schinkel, A. 1997.** The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8: 161-70.
- Schinkel, A., and J. Jonker. 2003.** Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 3-29.
- Schultz, R., J. Suominen, T. Varre, H. Hakovirta, M. Parvinen, J. Toppari, and M. Peltto-Huikko. 2003.** Expression of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator messenger ribonucleic acids and proteins in rat and human testis. *Endocrinology* 144: 767-76.
- Schuppe, H., P. Wieneke, S. Donat, E. Fritsche, F. Kohn, and J. Abel. 2000.** Xenobiotic metabolism, genetic polymorphisms and male infertility. *Andrologia* 32: 255-62.
- Sharma, R., and A. Agarwal. 1996.** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-50.
- Sharpe, R., and N. Skakkebaek. 1993.** Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 341: 1392-5.
- Shen, E., and J. J. Whitlock. 1992.** Protein-DNA interactions at a dioxin-responsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor. *J Biol Chem* 267: 6815-9.
- Shertzer, H., D. Nebert, A. Puga, M. Ary, D. Sonntag, K. Dixon, L. Robinson, E. Cienciolo, and T. Dalton. 1998.** Dioxin causes a sustained oxidative stress response in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 44-8.

- Shimada, T., C. Hayes, H. Yamazaki, S. Amin, S. Hecht, F. Guengerich, and T. Sutter. 1996.** Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 56: 2979-84.
- Siegel, D., A. Anwar, S. Winski, J. Kepa, K. Zolman, and D. Ross. 2001.** Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Mol. Pharmacol* 59: 263-8.
- Simanainen, U., A. Adamsson, J. Tuomisto, H. Miettinen, J. Toppari, J. Tuomisto, and M. Viluksela. 2004.** Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines. *Toxicol Sci* 81: 401-7.
- Sims, P., P. Grover, A. Swaisland, K. Pal, and A. Hewer. 1974.** Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252: 326-8.
- Soneda, S., M. Fukami, M. Fujimoto, T. Hasegawa, Y. Koitabashi, and T. Ogata. 2005.** Association of micropenis with Pro185Ala polymorphism of the gene for aryl hydrocarbon receptor repressor involved in dioxin signaling. *Endocr J* 52: 83-8.
- Song, Z., and R. Pollenz. 2002.** Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol Pharmacol* 62: 806-16.
- Strange, R., M. Spiteri, S. Ramachandran, and A. Fryer. 2001.** Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482: 21-6.
- Sunaga, N., T. Kohno, N. Yanagitani, H. Sugimura, H. Kunitoh, T. Tamura, Y. Takei, S. Tsuchiya, R. Saito, and J. Yokota. 2002.** Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 730-8.
- Swan, S., E. Elkin, and L. Fenster. 2000.** The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 108: 961-6.
- Swanson, H., and C. Bradfield. 1993.** The AH-receptor: genetics, structure and function. *Pharmacogenetics* 3: 213-30.
- Zaher, H., P. Fernandez-Salguero, J. Letterio, M. Sheikh, A. J. Fornace, A. Roberts, and F. Gonzalez. 1998.** The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Molecular Pharmacology* 54.
- Zappa, F., T. Ward, J. Butler, E. Pedrinis, and A. McGown. 2001.** Overexpression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human reproductive system. *J Histochem Cytochem* 49: 1187-8.
- Talalay, P., and A. Dinkova-Kostova. 2004.** Role of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in protection against toxicity of electrophiles and reactive oxygen intermediates. *Methods Enzymol* 382: 355-64.
- Tan, Y., C. Patten, T. Smith, and C. Yang. 1997.** Competitive interactions between cytochromes P450 2A6 and 2E1 for NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the microsomal membranes produced by a baculovirus expression system. *Arch Biochem Biophys* 342: 82-91.
- Tanaka, H., M. Fujisawa, H. Tanaka, H. Okada, and S. Kamidono. 2002.** Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele. *BJU Int.* 89: 905-9.
- Tetlow, N., and P. Board. 2004.** Functional polymorphism of human glutathione transferase A2. *Pharmacogenetics* 14: 111-6.
- Thomsen, J., S. Kietz, A. Ström, and J. Gustafsson. 2004.** HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 65: 165-71.
- Toppari, J., J. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, J. L. Guillette, B. Jégou, T. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J. McLachlan, O. Meyer, J. Müller, E. R.-D. Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter, and N. Skakkebaek. 1996.** Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104: 741-803.

- Tsuchiya, M., T. Katoh, H. Motoyama, H. Sasaki, S. Tsugane, and T. Ikenoue. 2005.** Analysis of the AhR, ARNT, and AhRR gene polymorphisms: genetic contribution to endometriosis susceptibility and severity. *Fertil Steril* 84: 454-8.
- Wakabayashi, K., A. Tamura, H. Saito, Y. Onishi, and T. Ishikawa. 2006.** Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology. *Drug Metab Rev* 38: 371-91.
- Valdez, E. K., and B. K. Petroff. 2004.** Potential roles of the aryl hydrocarbon receptor in female reproductive senescence. *Reproductive Biology* 4: 243-58.
- Wang, X., R. Sharma, S. Sikka, A. J. Thomas, T. Falcone, and A. Agarwal. 2003.** Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80: 531-5.
- Watanabe, M., K. Sueoka, I. Sasagawa, A. Nakabayashi, Y. Yoshimura, and T. Ogata. 2004.** Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor gene: implication for the susceptibility to dioxins. *Fertil Steril* 82: 1067-71.
- Watanabe, T., I. Imoto, Y. Kosugi, Y. Fukuda, J. Mimura, Y. Fujii, K. Isaka, M. Takayama, A. Sato, and J. Inazawa. 2001.** Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis. *J Hum Genet* 46: 342-6.
- Vella, F., G. Ferry, P. Delagrè, and J. Boutin. 2005.** NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol* 71: 1-12.
- WHO. 1999.** WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.
- Wiemels, J., A. Pagnamenta, G. Taylor, O. Eden, F. Alexander, and M. Greaves. 1999.** A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 59: 4095-9.
- Wiencke, J., M. Spitz, A. McMillan, and K. Kelsey. 1997.** Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 87-92.
- Wong, J., A. Okey, and P. Harper. 2001.** Human aryl hydrocarbon receptor polymorphisms that result in loss of CYP1A1 induction. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 990-6.
- Wormke, M., M. Stoner, B. Saville, K. Walker, M. Abdelrahim, R. Burghardt, and S. Safe. 2003.** The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23: 1843-55.
- Yamamotoa, J., K. Iharaa, H. Nakayamaa, S. Hikinoa, K. Satohb, N. Kuboc, T. Iida, Y. Fujiie, and T. Haraa. 2004.** Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: Organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sciences* 74: 1039-49.
- Yasui, H., S. Hayashi, and H. Sakurai. 2005.** Possible involvement of singlet oxygen species as multiple oxidants in p450 catalytic reactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 1-13.

Kasutatud internetileheküljed

Colorado ülikool, *Department of Integrative Physiology*

<http://www.colorado.edu/kines/Class/IPHY3430-200/image/figure20f.jpg>

Lisad

Lisa 1. Käesolevas töös uuritud geenid ja polümorfismid.

Geen	Rs number	Polümorfism	Aminohappeline muutus ja koodon
AhR	Rs2066853	G/A	Arg554Lys
AhRR	Rs2292596	C/G	Pro185Ala
ARNT	rs2228099	C/G	Val189Val
CYP1A1	Rs1048943	A/G	Ile462Val
	Rs1799814	A/C	Asn461Thr
CYP1A2	Rs2470890	T/C	Asn516Asn
CYP1B1	Rs10012	C/G	Arg48Gly
	Rs1056827	G/T	Ala119Ser
	Rs1056836	C/G	Leu432Val
	Rs1056837	C/T	Asp449Asp
	Rs1800440	A/G	Asn453Ser
SULT1A1	Rs9282861	G/A	Arg213His
	Rs1801030	A/G	Met223Val
GSTA1	Rs1051739	C/G	Cys112Ser
GSTM1	Rs1065411	C/G	Lys173Asn
GSTM3	Rs7483	A/G	Ile224Val
GSTP1	Rs1695	G/A	Ile105Val
	Rs1138272	T/C	Val114Ala
NQO1	Rs1800566	C/T	Pro187Ser
	Rs4986998	C/T	Arg139Trp
EPHX1	Rs2234698	C/T	Asp68Asp
	Rs1051740	T/C	Tyr113His
	Rs2234922	A/G	His139Arg
MDR1	Rs1045642	C/T	Ile1145Ile
	Rs1128503	C/T	Gly412Gly
	Rs2032582	A/G/T	Thr893Ala893Ser
ABCG2	Rs2231137	A/G	Met12Val
	Rs2231142	A/C	Lys141Gln

Lisa 2. Käesolevas töös iga lookuse puhul uuritud kontrollide ja patsientide arv.

Geen	SNP	Aminohappeline muutus ja koodon	Patsiendid (n)	Kontrollid (n)
CYP1A1	A/G	Ile462Val	116	165
CYP1A1	A/C	Asn461Thr	117	166
CYP1A2	T/C	Asn516Asn	115	162
CYP1B1	C/G	Arg48Gly	115	162
	G/T	Ala119Ser	117	162
	C/G	Leu432Val	113	157
	C/T	Asp449Asp	116	162
	A/G	Asn453Ser	111	161
SULT1A1	A/G	His213Arg	111	160
	A/G	Val223Met	112	153
GSTA1	C/G	Cys112Ser	92	123
GSTM1	C/G	Lys173Asn	103	142
GSTM3	A/G	Ile224Val	111	157
GSTP1	G/A	Ile105Val	116	162
	T/C	Val114Val	113	163
NQO1	C/T	Pro187Ser	114	164
	C/T	Arg139Trp	116	165
EPHX1	C/T	Asp68Asp	115	164
	T/C	Tyr113His	113	162
	A/G	His139Arg	115	165
MDR1	C/T	Ile1145Ile	114	161
	C/T	Gly412Gly	114	163
	A/G/T	Thr893Ala893Ser	107	143
ABCG2	A/C	Lys141Gln	105	159
	A/G	Met12Val	115	161